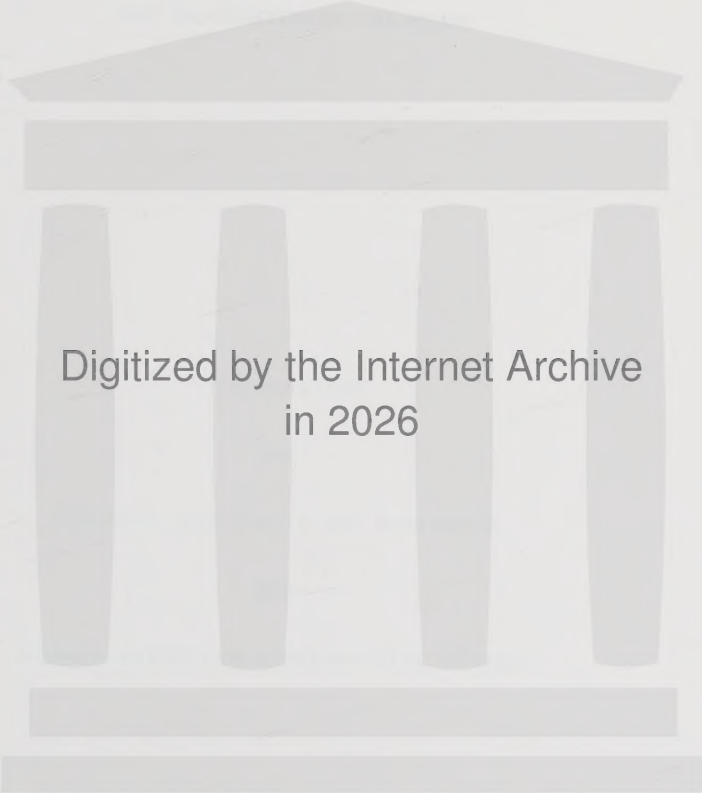


Zur Biosynthese des Bakterioopsins

Ein zellfreies Translationssystem
aus Halobakterium halobium

Roswitha Schöningh

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ZUR BIOSYNTHESE DES BAKTERIOOPSINS

EIN ZELLFREIES TRANSLATIONSSYSTEM

AUS HALOBAKTERIUM HALOBIVM

Dissertation

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Roswitha Schöningh

München 1985

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1980 bis März 1984 auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof.Dr.D.Oesterhelt am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried erstellt.

1.Berichterstatter: Prof. Dr. D. Oesterhelt

2.Berichterstatter: Prof. Dr. E. Winnacker

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1985

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A Zusammenfassung	1
B Einleitung	5
C Material und Methoden	15
1. Material	15
1.1 Chemikalien	15
1.2 Enzyme	15
1.3 Lösungen	15
1.4 Bakterienstämme	16
2. Methoden	16
2.1 Zucht der Bakterien	16
2.2 <u>In vivo</u> Markierung des Bakterioopsins durch ³⁵ S-Methionin unter Verwendung verschiedener Energiequellen	17
2.3 Isolierung der weißen Membran aus dem Stamm JW-5	18
2.4 Kristallisation der weißen Membran <u>in vitro</u>	18
2.5 Wachstum der Mutante JW-5 in Gegenwart von Retinal und Retinalanalogen	19

2.5.1	Bestimmung des Opsingehaltes	19
2.5.2	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Retinalanaloge im Chromophor	19
2.5.3	Bestimmung der Pumpaktivität der Retinalanalogen in Zellvesikeln	20
2.5.4	Autrennung der Membranen im Sucrosegra- dienten	20
2.6	Versuch zur Identifizierung des Bakterio- opsinvorläufers im Cytoplasma	20
2.6.1	Inkubation der Zellen mit CCCP	20
2.6.2	Präparation des cytoplasmatischen Überstandes	21
2.6.3	Gelfiltration des cytoplasmatischen Überstandes	21
2.6.4	Dichtezentrifugation des cytoplasmati- schen Überstandes	21
2.7	<u>In-vitro</u> -Translation	22
2.7.1	Präparation des Rohextrakts	22
2.7.2	Präparation von freien und membrangebun- denen Polysomen	22
2.7.3	Isolierung der Ribosomen aus dem Rohextrakt.	23
2.7.4	Vorinkubation des Rohextrakts	24
2.7.5	Micrococcus Nuklease Behandlung des Rohextrakts und des S_{100} Überstandes	24
2.7.6	Translation mit dem Zellrohextrakt	26
2.7.7	Translation mit freien und membrangebun- denen Polysomen	27
2.7.8	Rekonstitution des Translationssystems	27
2.7.9	Rekonstitution der tRNS-Beladung im Micrococcus Nuklease behandelten S_{100} Überstand	27

2.7.10	Translation exogener mRNA im homologen System	28
2.7.11	Quantitative Bestimmung des Einbaus von ^{35}S -Methionin in präzipitierbares Material	28
2.7.12	Bereitung der Proben für die SDS-Gelelektrophorese	29
2.8	Anreicherung der mRNA aus Halobacterium halobium	29
2.9	Analytische Methoden	31
2.9.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
2.9.2	RNS-Gelelektrophorese	31
2.9.3	Größenbestimmung der Bacteriopsin-mRNA	32
2.9.4	Proteinbestimmung	32
2.9.5	Bestimmung der Ribosomenkonzentration	32
2.10	Filterhybridisierung der RNS	33
2.10.1	Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten RNS	33
2.10.2	Hybridisierung der RNS	33
2.11	Nicktranslation	34
2.12	Immunologische Methoden	34
2.12.1	Immunisierung der Kaninchen	34
2.12.2	Gewinnung des Serums	35
2.12.3	Elektrophoretischer Transfer der Proteine auf Nitrocellulose	35
2.12.4	Immunreplikatechnik	35
2.12.5	Bestimmung des Titers	36

D Ergebnisse

1. <u>In vivo</u> Versuche zur Biosynthese des Bakterioopsins	37
1.1 Versuche zur Regulation der Bakterioopsin Synthese	37
1.1.1 Charakterisierung der Mutante JW-5	37
1.1.2 Wachstum des Stammes JW-5 mit Retinal	41
1.1.3 Wachstum des Stammes JW-5 mit Retinalanalogen	43
1.2 Suche nach dem Vorläufer im Cytoplasma	48
1.2.1 Einfluß des CCCPs auf das Wachstum der Zellen und die Synthese des Bakterioopsins	49
1.2.2 Versuch zur Identifizierung des Bakterioopsins oder verwandten Proteinen im Cytoplasma	51
1.3 <u>In vivo</u> Markierung mit Arginin als Energiequelle	56
1.3.1 Vergleich der Energiequellen Licht/O ₂ , Alanin/O ₂ und Arginin/N ₂	56
1.3.2 Versuch der Überführung des 125 K Proteins in Bakterioopsin	59
2. <u>In vitro</u> Versuche zur Biosynthese des Bakterioopsins	61
2.1 <u>In-vitro</u> -Translation mit einem Zellrohex-takt aus <i>Halobacterium halobium</i>	62
2.2 Anreicherung und Identifizierung der Bakterioopsin-mRNS	66

2.3	Vergleich der Translations- und Transkriptionsprodukte der Stämme JW-5 und L33	69
2.3.1	Vergleich der Translationsprodukte	69
2.3.2	Vergleich der Transkriptionsprodukte	70
2.4	Isolierung von freien und membrangebundenen Polysomen	72
2.5	Versuche zur spezifischen Translation in Halobacterium halobium	75
2.5.1	Abbaudes endogenen Messengers durch Vorinkubation.	75
2.5.2	Abbau des endogenen Messengers durch Micrococcus-Nuclease	77
2.5.3	Reaktivierung der Translation durch Zugabe von exogener mRNS.	79
2.5.4	Isolierung der Ribosomen aus dem Rohextrakt	81
2.5.5	Rekonstitution des Translationssystems	81
2.5.6	Inkubation des S ₁₀₀ Überstandes mit Micrococcus Nuclease	82
2.5.7	Reaktivierung der Beladung mit Hefe tRNS	83
2.5.8	Translation von exogener mRNS	84
E	Diskussion	88
F	Literatur	99
G	Abkürzungen	106

A Zusammenfassung

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, daß Bakteriorhodopsin als Vorläufer mit einer N-terminalen Verlängerung von 13 Aminosäuren synthetisiert wird. Eine genauere Untersuchung von Biosynthese und Prozessierung des Proteins lag jedoch nicht vor, da der Vorläufer nur in Sphaeroplasten radioaktiv markiert werden konnte. Unter diesen Bedingungen wurde das Protein auch nach Konversion der Sphaeroplasten zu intakten Zellen nicht prozessiert. Ziel der Arbeit war es, durch in-vitro Translation und Markierung in intakten Zellen den Vorläufer zu identifizieren und seine Prozessierung zum reifen Protein zu verfolgen. Hierbei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) Es wurde ein in-vitro Translationssystem für **Halobacterium halobium** erstellt. Im Zellrohextrakt konnte eine Aktivität von $1.5 \cdot 10^{-3}$ Molekülen Met/Ribosom/45 min erreicht werden. Die Hauptprodukte der Translation besaßen ein Molekulargewicht von 96,80,62 und 56 kD. Überraschenderweise war kein Produkt in der Größe des Bakterioopsins oder seines Vorläufers zu erkennen, obwohl der Extrakt aus Zellen bereitet wurde, die zum Zeitpunkt der Maximalsynthese des Bakterioopsins aufgearbeitet wurden.
- (2) Die mRNA des Bakterioopsins wurde angereichert und durch Filterhybridisierung als 0,7 kB großes RNS Molekül identifiziert. Es wurde nachgewiesen, daß zum Zeitpunkt der Ernte der Zellen die mRNA des Bakterioopsins eine prominente Bande im RNS-Gel darstellt und damit die hohe Syntheserate in intakten Zellen widerspiegelt.
- (3) Durch Vergleich der in-vitro-Translationsprodukte des

Bakterienstammes ET 1001 mit L-33 als bakterioopsin-defizientem Stamm konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei den hochmolekularen Produkten nicht um Bakterioopsin verwandte Proteine handelte. Die Proteinmuster der Translationsprodukte beider Stämme waren identisch. Durch Filterhybridisierung mit dem klonierten Bakterioopsin-gen konnte gezeigt werden, daß die Insertion zu Beginn des Bakterioopsin-gens im Stamm L-33 die Transkription einer vollständigen Bakterioopsin-mRNS verhinderte. Es konnten jedoch zwei kleinere Transkriptionsfragmente nachgewiesen werden.

- (4) Aus *Halobacterium halobium* wurden freie und membrangebundene Polysomen isoliert. Die für *E. coli* ausgearbeiteten Vorschriften wurden dabei der hohen Ionenstärke der halobakteriellen Extrakte angepaßt. Die Translationsprodukte der freien und membrangebundenen Polysomen waren identisch und zeigten wiederum kein Protein in der Größe des Bakterioopsins. Damit war bewiesen, daß unter diesen Bedingungen die Anwesenheit der Membran allein nicht ausreicht, die mRNS des Bakterioopsins zu translatieren.
- (5) Nach Abbau der endogenen mRNS durch Nuklease konnte die Translation exogener mRNS nachgewiesen werden. Die Nuklease Behandlung mußte für die hohe Ionenstärke optimiert werden. Reproduzierbare Ergebnisse konnten nur erzielt werden, wenn die Ribosomen vor der Inkubation aus dem Rohextrakt entfernt wurden. Das anschließend mit Ribosomen rekonstituierte System konnte mit mRNS und mit Gesamt-RNS reaktiviert werden. Hier konnte der Einbau von radioaktiv markiertem Methionin um den Faktor von 2,5 mit mRNS und von 2 mit Gesamt-RNS gesteigert werden.
- (6) Durch Vergleich der Translationsprodukte der RNS aus dem Bakterienstamm R₁ vor und nach Infektion mit dem

halobakteriellen Phagen ϕH_1 konnten neue Produkte nachgewiesen werden. Die Proteine hatten ein Molekulargewicht von 110.108,80 und 43 kD. Unter denselben Bedingungen konnte wiederum kein Bakteriorhodopsin nachgewiesen werden, selbst wenn zur Translation die Bakterioopsin-messenger reiche RNS-Fraktion eingesetzt wurde. Diese Ergebnisse ließen den Schluß auf einen cotranslationalen Prozessierungsmechanismus zu.

- (7) Immunologisch konnte Bakterioopsin im Cytoplasma nachgewiesen werden. Zur vollständigen Entfernung der Membranen aus dem cytoplasmatischen Überstandes von Membranen wurden zwei Techniken angewandt: Gelfiltration und Dichtezentrifugation des cytoplasmatischen Überstandes. Da es sich bei dem identifizierten Protein nicht um den Vorläufer des Bakterioopsins handelte, konnte dieses Ergebnis nicht im Sinne eines postrationalen Prozessierungsmechanismus gedeutet werden.
- (8) Auch bei Reduktion des Membranpotentials in intakten Zellen mit Hilfe eines Entkopplers (CCCP) wurde kein Vorläufer des Bakterioopsins im Cytoplasma akkumuliert. Zwar traten in Gegenwart des Entkopplers zwei schwerere Bakterioopsinbanden auf, da diese Proteine jedoch nicht im Cytoplasma nachgewiesen werden konnten, ließ sich das Ergebnis nicht im Sinne eines postrationalen Prozessierungsmechanismus deuten.
- (9) In vivo Markierungsexperimente unter anaeroben Bedingungen mit Arginin als Energiequelle markierten ein Protein mit einem Molekulargewicht von 125 kD. Da unter aeroben Bedingungen Bakterioopsin das Hauptprodukt der Biosynthese war, mußte gezeigt werden, ob es sich bei diesem Protein um ein dem Bakterioopsin verwandtes Protein handelte. Dies wurde durch ein

'pulse-chase' Experiment ausgeschlossen. Das 125 kD Protein ließ sich auch nach dem Wechsel auf aerobe Bedingungen nicht in Bakterioopsin überführen.

- (10) Durch Wachstumsveruche mit der retinalfreien Mutante JW-5 mit Retinalanalogen konnte gezeigt werden, daß die Opsinsynthese durch Retinal selbst stimuliert wird und nicht wie vorher vermutet das freie Opsin seine eigene Synthese inhibiert.
- (11) Mit einer isolierten bakterioopsinhaltigen Membran des Stammes JW-5 konnte das von M.Sumper entwickelte Modell widerlegt werden, das die Kristallisation des Bakteriorhodopsins in der Purpurmembran als energieabhängigen Schritt darstellte. Wie durch Röntgenbeugung bestätigt werden konnte, kann die rekonstituierte weiße Membran in Gegenwart von Salz in vitro kristallisiert werden. Der Vergleich der Röntgenbeugungsmuster zeigte, daß die verbliebenen Lipide die Gitterstruktur ändern.

B Einleitung

1. Der Transport und die Prozessierung von Membranproteinen

Für den Transport und die Prozessierung von Membranproteinen sind mehrere Modelle entwickelt worden, die in der Signalthypothese und der Membran-Trigger Hypothese in ihren Extremen formuliert sind. Die Modelle müssen zwei Phänomene erklären: Zum einen die Synthese eines hydrophoben Proteins im hydrophilen cytoplasmatischen Medium und zum anderen den Transport des Proteins zum Ort seiner Funktion.

1975 entwickelten Blobel und Dobberstein die Signalthypothese für sekretorische Proteine in Eukaryonten. Nach dem 1981 modifizierten Modell (Abb.1a; Walter et al. 1981) werden sekretorische-, lysosomale- und Membranproteine als Vorläufer mit einer N-terminalen Verlängerung von 15-30 Aminosäuren synthetisiert, die als Signal zum Transport des Proteins in die Membran des endoplasmatischen Retikulums dienen. Wesentlicher Bestandteil dieses Prozessierungsmechanismus ist ein Ribonukleinsäure-Proteinkomplex ("signal recognition particle", "SRP"), der die Translation des Messengers an die Translokation des Proteins durch die Membran koppelt. Der Komplex besteht aus einer 7S RNS und sechs verschiedenen Polypeptidketten. Das SRP erkennt die Signalsequenz des Vorläuferproteins und bewirkt durch die Bindung an das Ribosom eine Translationshemmung, die erst nach der Bindung des gesamten Komplexes an ein Rezeptorprotein (docking protein) der Membran des endoplasmatischen Retikulums aufgehoben wird. Noch während der Messenger weiter translatiert wird, durchdringt der N-Terminus des Proteins die Membran und wird von der im Lumen des endoplasmatischen Retikulums befindlichen Protease abgeschnitten. Durch diese cotranslationale Prozessierung wird der Kontakt des hydrophoben Membranproteins mit dem

hydrophilen Milieu des Cytoplasmas vermieden.

Nach der von Wickner formulierten Membran-Trigger-Hypothese werden Membranproteine posttranslational prozessiert (Wickner 1979) (Abb.1b). Erst nach vollendeter Synthese binden die Vorläuferproteine an die Membran, wo sie dann von der Protease zum reifen Protein prozessiert werden. Die N-terminale Verlängerung signalisiert nicht die Bindung an die Membran, sondern induziert eine Sekundärstruktur, die die hydrophoben Aminosäuren im Protein verbirgt. Erst in der Membran faltet sich das Protein gemäß seiner nativen Struktur. Die Integration des Vorläuferproteins in die Membran ist energieabhängig und kann durch Zerstören des Membranpotentials verhindert werden. Dieses Modell, das ursprünglich für das M13 Hüllprotein entwickelt wurde (Wickner 1979), gilt auch die bisher untersuchten, im Zellkern kodierten Proteine der Mitochondrienmembran.

Der Vorläufer der β -Untereinheit der F_1 ATPase beispielsweise, ein an der inneren mitochondrialen Membran lokalisiertes Protein, konnte in vivo im Cytoplasma nachgewiesen werden (Reid & Schatz 1982a). Nach Beseitigung des Membranpotentials wurde das Protein nicht an die Mitochondrienmembran transloziert, sondern akkumulierte im Cytoplasma (Reid und Schatz 1982b). Da die isolierte Protease auch in vitro die β -Untereinheit prozessieren kann (McAda & Douglas 1982), ist die Energetisierung der inneren Membran nicht für den proteolytischen Schritt notwendig, sondern für die Translokation des Proteins an die Membran.

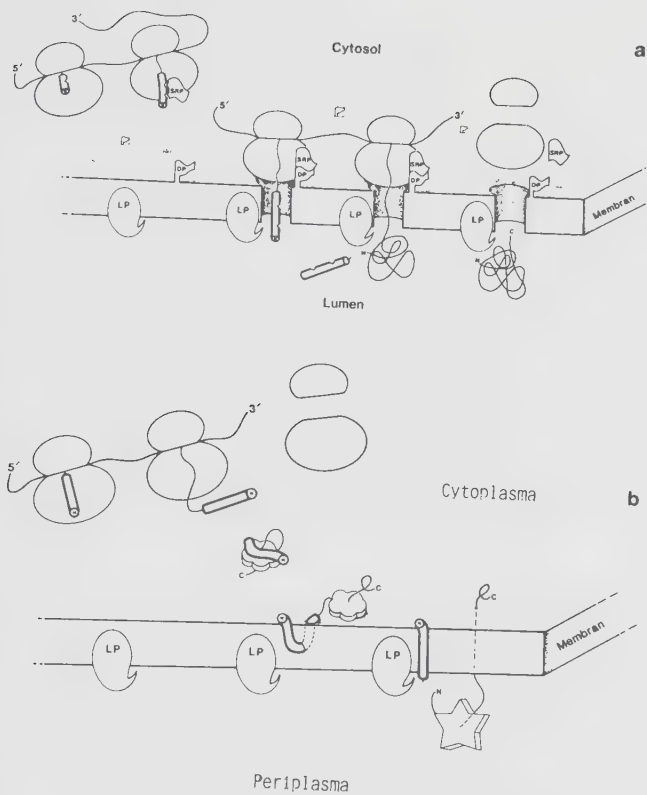


Abb.1a Die Signalthypothese. SRP signal recognition particle; LP leader peptidase; **1b** Die Membran-Trigger Hypothese; (Randall & Hardy 1984)

Die Untersuchungen von prokaryontischen Membranproteinen ergeben bis jetzt kein einheitliches Bild. Einerseits sind die prokaryontischen Signalsequenzen nicht von eukaryontischen zu unterscheiden und werden auch nach eukaryontischem Muster vom SRP erkannt und prozessiert wie am Beispiel der β -Lactamase gezeigt werden konnte (Müller et al. 1982), andererseits läßt sich für andere Membranproteine wie beispielsweise dem M 13 Hüllprotein ein posttranslationaler Prozessierungsmechanismus nachweisen (Ito et al. 1979). Obwohl bislang kein SRP in *E. coli* nachgewiesen werden konnte, gibt es Hinweise auf die Beteiligung eines cytoplasmatischen Faktors an der Prozessierung eines prokaryontischen Membranproteins. Eine Punktmutation in der Signalsequenz des λ -Rezeptors, eines in der äußeren *E. coli* Membran lokalisierten Proteins, verhindert die Einlagerung des Proteins in die Membran, Pseudorevertanten dieser Stämme werden bei unverändert mutierter Signalsequenz korrekt in die Membran eingelagert und prozessiert. Die zusätzliche Mutation, die den Defekt der ersten aufhebt, konnte im Bereich der ribosomalen Proteine lokalisiert werden (Emr et al. 1981).

Andere genetische Untersuchungen an *E. coli* deuten auf ein prokaryontisches Äquivalent des eukaryontischen docking-Proteins hin (Oliver & Beckwith 1982 und 1983). Stämme, die im secA-Gen mutiert sind, akkumulieren die Vorläufer von Membranproteinen im Cytoplasma. Da es Hinweise darauf gibt, daß das secA-Genprodukt in der cytoplasmatischen Membran lokalisiert ist (Oliver & Beckwith 1982), könnte diese Mutation als Defekt eines am Export beteiligten Proteins interpretiert werden.

2. Halobacterium halobium

Die Biosynthese des Membranproteins Bakterioopsin aus **Halobacterium halobium** erschien aus folgendem Grund interessant. **Halobacterium halobium** gehört zur Gruppe der Archaeobakterien, die neben den Eubakterien und Eukaryonten ein eigenständiges Urreich bilden (Woese & Fox 1977). Alle Archaeobakterien siedeln in extremen ökologischen Nischen und tragen eukaryontische Merkmale. Ihre RNA-Polymerasen beispielsweise setzen sich aus 7-12 Untereinheiten zusammen, von denen die größten den großen Untereinheiten der Polymerase I und II aus Hefe strukturell verwandt sind (Schnabel et al. 1983). Der Translationsapparat zeigt ebenfalls mehr eukaryontische als eubakterielle Merkmale. So ist wie in Eukaryonten der Elongationsfaktor EF2 durch Diphtherietoxin ADP ribosylierbar (Kessel und Klink 1980) und die Sequenz des ribosomalen A Proteins dem entsprechenden eukaryontischen ähnlich (Matheson und Yaguchi 1982). Auch die elektronenmikroskopisch sichtbare Struktur der ribosomalen Untereinheiten weist auf die Verwandtschaft zu den Eukaryonten hin (Lake et al. 1982).

Halobacterium halobium bildet zusammen mit den methanogenen Bakterien einen Zweig innerhalb des archaeobakteriellen Reiches. Als strikt halophiler Organismus ist er auf hohe Natrium- oder Kaliumchlorid Konzentrationen angewiesen. Die idealen Lebensbedingungen finden die Bakterien im Konzentrationsbereich nahe der Sättigung, die kritische Salzkonzentration, unterhalb derer die Zellen lysieren, liegt bei 12%. Die Halophilie gilt auch für die Ribosomen, die zur Stabilität KCl-Konzentrationen nahe der Sättigung benötigen (Bayley & Kushner 1964).

3. Bakteriorhodopsin

Bakteriorhodopsin ist das einzige Protein in der Purpurmembran von *Halobacterium halobium*. Durch Elektronenbeugung und Elektronenmikroskopie konnten Henderson & Unwin erstmals 1975 ein Modell des Bakteriorhodopsins in der Membran entwickeln. Nach diesem Modell besteht Bakteriorhodopsin aus sieben α -Helices, die integral in die Membran eingelagert sind. In der Purpurmembran liegt das Bakteriorhodopsin als Trimer vor: die Trimere sind ihrerseits dicht in einem hexagonalen Gitter angeordnet mit nur 10 Lipidmolekülen/Bakteriorhodopsin. Aus dieser dichten Packung resultiert die ungewöhnlich hohe Dichte der Membran von $1.18 \text{ (g/cm}^3\text{)}$. Bakteriorhodopsin ist ein Chromoprotein mit einem Absorptionsmaximum bei 570 nm. Als prosthetische Gruppe enthält es Retinal, das als Schiff'sche Base kovalent an das Lysin 216 gebunden ist (Lemke & Oesterhelt 1981; Bayley et al. 1981). Bakteriorhodopsin funktioniert als lichtgetriebene Protonenpumpe, die es den Zellen ermöglicht auch unter Sauerstoffmangelbedingungen ATP zu synthetisieren.

4. Regulation der Bakterioopsinsynthese

Die Synthese des Bakterioopsins wird durch die Wachstumsbedingungen reguliert. Bei limitierter Sauerstoffzufuhr ist Bakterioopsin in der späten logarithmischen und frühen stationären Wachstumsphase das Hauptprodukt der Biosynthese (Oesterhelt & Stoeckenius 1973). Unter diesen Bedingungen kann die Purpurmembran bis zu 50% der Zelloberfläche einnehmen. Über die regulatorische Wirkung des Sauerstoffs auf molekularer Ebene ist noch nicht bekannt.

Neben der Regulation durch Sauerstoff beobachtet man noch

eine Stimulierung durch Retinal. In retinalfreien Zellen ist der Bakterioopsingehalt mindestens auf 30% reduziert. Die Zellen erreichen jedoch nach Zugabe von exogenem Retinal zum Wachstumsmedium wieder ihren natürlichen Bakterioopsingehalt. Das gleiche Ergebnis erhält man, wenn die Zellen in Gegenwart von Nikotin wachsen (Sumper & Herrmann 1976). Nikotin blockiert die Retinalsynthese durch Verhinderung der Zyklisierung des Lycopins zu β -Carotin (Howes & Batra 1970). Durch Wachstumsversuche in Gegenwart von Nicotin oder dem Retinalanalog 4-Ketoretinal konnte M.Sumper (Sumper und Herrmann 1976) zeigen, daß

- (1) Bakterioopsin auch synthetisiert wird, wenn die Synthese des Retinals durch Nicotin blockiert ist.
- (2) in Gegenwart des 4-Ketoretinals kein Retinal synthetisiert wird,
- (3) das synthetisierte Bakteriorhodopsin als Chromophor das modifizierte Retinal enthält, und
- (4) die Bakteriorhodopsinkonzentration den natürlichen Gehalt erreicht.

Auf der Grundlage dieser Versuche entwickelte M.Sumper ein Modell, das eine koordinierte Synthese des Retinals und des Bakterioopsins forderte (Abb.2).

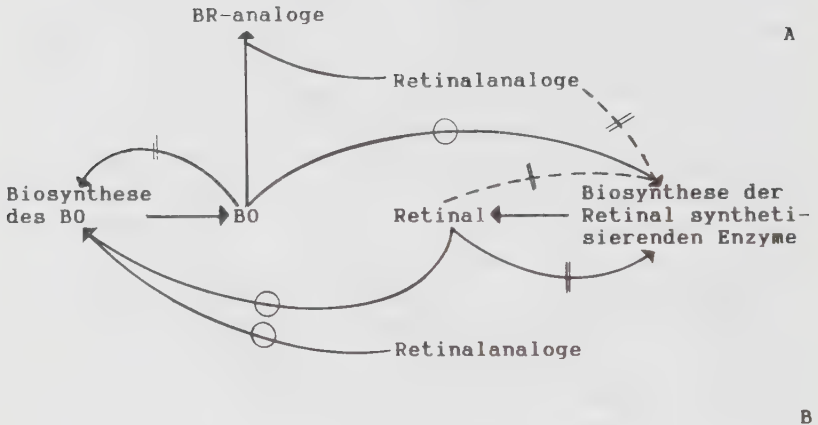


Abb.2 Modell zur koordinierten Synthese des Bakterioopsins und des Retinals. **A** Die von M.Sumper entwickelte Vorstellung der Kontrolle der Bakterioopsinsynthese durch freies Bakterioopsin. **B** Alternative Interpretation, die Retinal als Stimulator der Bakterioopsinsynthese darstellt. — Reaktionspfeile, —|— Inhibition, —○— Stimulation

Nach M.Sumpers Interpretation der Versuche schlossen diese Ergebnisse eine Induktionswirkung des Retinals auf die Bakterioopsinsynthese aus, da Bakterioopsin auch in Abwesenheit des Retinals synthetisiert wurde. Zur Regulation der Retinalsynthese diskutierte er die Produktinhibition durch Retinal und eine positive Kontrolle durch freies Bakterioopsin. Nach seiner Vorstellung war die Retinalsynthese in Gegenwart von 4-Ketoretinal blockiert, weil das synthetisierte Bakterioopsin nie frei vorlag, sondern sofort vom 4-Ketoretinal weggefangen wurde. Die Ergebnisse lassen

jedoch als Interpretation auch einen direkten Einfluß des Retinals auf die Bakterioopsin- und Retinalsynthese zu. Diese Hypothese wird gestützt durch den Phanotyp des Stamms L-33, der trotz seiner Bakterioopsindefizienz Retinal positiv ist (Steiner, M. 1984).

5. Die Biosynthese des Bakterioopsins

Durch in vivo Markierung in Sphaeroplasten war bekannt, daß das Bakterioopsin als Vorläufer mit einer N-terminalen Verlängerung von 13 Aminosäuren synthetisiert wird (Dellweg und Sumper 1980). Die durch Radiosequenzierung partiell ermittelte Sequenz wurde später durch die Sequenz des Gens ergänzt und bestätigt (Chang et al. 1981).

Met Leu Glu Leu Leu Pro Thr Ala Val Glu Gly Val Ser

Abb.3 N-terminale Sequenz des Bakterioopsinvorläufers (Chang et al. 1981).

Die Sequenz ist ungewöhnlich und läßt sich nicht mit bereits bekannten eukaryontischen und prokaryontischen Signalsequenzen vergleichen (Emr et al. 1980; Sabatini et al. 1982). Sie ist kürzer als die meisten anderen und zeigt auch nicht die typische Unterteilung in einen hydrophilen und hydrophoben Bereich. Aus diesem Grunde ist ihre Funktion als Signal fraglich. Da bisher alle Versuche, den Vorläufer in intakten Zellen zu markieren, mißlingen, waren Aussagen über den Prozessierungsmechanismus nicht möglich. Auch die Versuche in Sphaeroplasten führten zu keinem Ergebnis, da nach Konversion der Sphaeroplasten in stabchenförmige Zellen der Vorläufer nicht mehr ins reife Protein überführt werden

konnte (Seehra & Khorana 1984).

M. Steiner (1980) konnte zeigen, daß in der Purpurmembran noch zwei weitere Proteine befinden, die sich vom Bakterioopsin nur durch eine N-terminale Verlängerung von drei beziehungsweise sechs Aminosäuren unterscheiden. Die Sequenz ergab, daß es sich bei den Proteinen um partiell prozessierte Vorläuferproteine handelte. Ob dies ein Hinweis auf eine stufenweise Prozessierung ist, wie man es vom Vorläufer des Cytochrom C₁ (Daum et al. 1982) aus Hefe kennt, oder aber die Protease unspezifisch schneidet, ist nicht bekannt. Wie Seehra und Khorana (1984) zeigen konnten, hindert die N-terminale Verlängerung nicht die kristalline Struktur der Membran und beeinflußt auch nicht die Aktivität des Proteins.

Ziel dieser Arbeit war es, durch Versuche in vivo und in vitro den Vorläufer des Bakterioopsins zu markieren und den Prozeß zum reifen Protein zu verfolgen. Durch Wachstumsversuche eines retinaldefizienten Stammes mit Retinalanalogen sollte die Frage geklärt werden, ob Bakterioopsin seine eigene Synthese inhibiert oder aber Retinal direkt die Synthese des Bakterioopsins stimuliert.

C Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

^{32}P -ATP, ^{35}S -Methionin: Amersham-Buchler, Braunschweig
 CsCl: Baker, Groß-Gerau
 dNTPs, Kalbsthymus-DNA, DNS-Längenstandards, Ethidiumbromid,
 Acrolein, Hefe tRNA: Boehringer Mannheim
 Nitrocellulose: Schleicher und Schüll
 NaATP, NaGTP, NaPEP, FITC, BSA, CCCP: Sigma, ST. Louis,
 Missouri
 Nicht eigens aufgeführte Chemikalien wurden in der höchst
 erhaltlichen Reinheitsstufe von der Firma Merck, Darmstadt
 bezogen.

1.2 Enzyme

DNase I, Kornberg Polymerase für die Nicktranslation:
 Boehringer, Mannheim
 Micrococcus Nuclease: PL-Biochemicals

1.3 Lösungen

Basalsalz:	NaCl	25 %
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	2 %
	KCl	0.2 %
	Na ₃ Citrat	0.3 %

Der pH wurde auf 7.0 eingestellt.

Translationspuffer:	KCl	3.4	M
	MgAcetat	0.1	M
	HEPES	0.01	M pH 7.6

1.4 Bakterienstämme

Die in vivo Markierungsversuche wurden mit den Stämmen JW-5 und ET 1001 durchgeführt. Bei diesen Stämmen handelt es sich um Bakterioopsin Überproduzenten, die keine Gasvakuolen und keine Bakterioruberine besitzen (Betlach et al. 1983). Der Stamm JW-5 wurde von Jürgen Weber durch Mutagenese aus dem Stamm ET 1001 hergestellt. Er unterscheidet sich vom Stamm ET 1001 durch einen Block im Retinalbiosyntheseweg, der sich phänotypisch im Fehlen des Bakteriorhodopsins und der Purpurmembraan bemerkbar macht.

Die in-vitro-Translationssysteme wurden aus den Stämmen L-33, JW-5 und Et 1001 präpariert. Bei dem Stamm L-33 handelt es sich um einen bakterioopsin-defizienten Stamm (Wagner et al. 1981).

2. Methoden

2.1 Zucht der Bakterien

Das Wachstum von *Halobakterium halobium* erfolgte unter Sauerstoffmangel in Kompletmedium bei 40°C (Oesterheldt und Stoeckenius, 1974). Die Kulturen wurden mit 5% Inokulum aus einer Stammkultur angeimpft. Unter diesen Bedingungen erreichen die Stämme Et 1001 und JW-5 nach 4 Tagen mit einer OD_{440} von 0.4- 0.5 die frühe stationäre Wachstumsphase. Für die Herstellung des Zellrohextrakts wurden 700 ml

Zellkultur, für die in vivo Versuche 35, 200 und 700 ml Zellkultur verwendet.

2.2 In vivo Markierung des Bakterioopsins durch ^{35}S -Methionin unter Verwendung verschiedener Energiequellen

Zur in vivo Markierung wurden die Zellen nach der Methode von Sumper und Herrmann (1978) vorbereitet. 200 ml Zellkultur (JW-5) wurden am 4. Tag des Wachstums bei einer $\text{OD}_{660\text{ nm}}$ 0.44 durch Zentrifugation mit 10000 g, 10 min, geerntet. Die Zellen wurden mit BS gewaschen, in 200 ml BS aufgenommen und 3 h durch Weiterschütteln unter normalen Wachstumsbedingungen ausgehungert. Die Zellen wurden erneut 10 min bei 10000 g zentrifugiert und in BS suspendiert ($\text{OD}_{660\text{ nm}}$ 2.0). 5 ml dieser Suspension wurden im Reagenzglas unter leichtem Rühren mit einem Magnetrührer bei 37°C inkubiert. Die Inkubationstemperatur wurde durch Einsetzen des Reagenzglases in eine thermostatisierbare Glasküvette (40°C) erreicht.

Als Energiequellen wurden Ala/O_2 , Licht/O_2 , oder Arg/N_2 verwendet und zur biosynthetischen Markierung der Proteine wurden 1.7 μCi ^{35}S -Methionin (Amersham; 1440 Ci/mMol) eingesetzt.

Probe (1) wurde zum Zeitpunkt 0 mit 0.5% Alanin versetzt.

Probe (2) wurde mit 60 nMol Retinal versetzt und zum Zeitpunkt 0 mit einer Wolframlampe (250 W), unter Verwendung eines Filters (Schott OG 515) bestrahlt.

Probe (3) wurde zum Zeitpunkt 0 von Luft auf Stickstoff umgestellt und mit 0.5% Arginin versetzt.

Probe (4) wurde 30 min vor Start der Reaktion unter Stickstoff inkubiert und anschließend mit 0.5% Arginin versetzt.

Probe (5) wurde ohne Energiequelle unter Stickstoff inkubiert.

Nach 15, 30, 60, 120, 240 und 300 min wurden jeweils 500 μl

entnommen, zum Stoppen der Reaktion mit 3 ml kaltem Basalsalz (-15°C) versetzt und 3 min mit 10000 g bei 0°C zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 200 µl H₂O lysiert und mit DNase versetzt. 10 µl dieser Proben wurden in 3 ml Szintillationslösung (Rotiszint 22; C.Roth K.G.) gezählt. Zur Präparation für das SDS-Gel wurden 5 µl in 30 µl Probenpuffer gekocht (Lämmli 1970, Steiner 1980).

2.3 Isolierung der weißen Membran aus dem Stamm JW-5

Die weiße Membran wurde wie die Purpurmembran nach der Methode von Oesterheld & Stoeckenius (1974) isoliert. Aus 10 l Zellkultur (OD 0.9-1) konnten 1 µMol Bakteriopsin gewonnen werden. Der Bakteriopsingehalt wurde wie unter C 2.5.1 durch Rekonstitution mit Retinal bestimmt.

2.4 Kristallisation der weißen Membran in vitro

300 µl der weißen Membran (OD 1.3) wurden mit 2 ml BS +/- Retinal (25 µM) oder 2 ml NaAcetat (10 mM; pH 5) versetzt und 15 h bei 40°C inkubiert. Die Proben wurden bei 80000 g 30 min zentrifugiert, in 500 µl H₂O aufgenommen, auf einen Rohrzuckergradienten (20-45% w/v in 19 mM Tris pH 7.5) gegeben und bei 28000 rpm (Kontron TST 41 Ausschwingrotor) zentrifugiert. Die in Basalsalz inkubierten Membranen wurden isoliert, 500 µl der Lösung mit 5 mg n-Octyl-β-Dglucopyranosid versetzt und abermals 16 h bei 40°C gerührt. Diese Proben wurden ebenfalls auf dem Sucrosegradienten analysiert.

2.5 Wachstum der Mutante JW-5 in Gegenwart von Retinal und Retinalanalogen

Die Versuche wurden mit 35 oder 200 ml Kulturmedium durchgeführt. Die Zugabe von Retinal oder den Retinalanalogen erfolgte am 2., 3. und 4. Tag des Wachstums. Die Gesamtmenge der zugegebenen Retinale betrug 13.2 nMol für 35 ml Medium und 60 nMol für 200 ml Medium. Die Verbindungen lagen als methanolische Lösungen (10^{-3} – 10^{-4} M) vor. Die Zellen wurden am 5. Tag abzentrifugiert, in 3 ml H_2O lysiert und vermessen.

2.5.1 Bestimmung des Opsingehaltes

Der Opsingehalt wurde spektroskopisch (Aminco DW-2) durch die Absorption des Chromophors bestimmt. Zur Bestimmung der Chromophorkonzentration im Zellysat wurden 100 μ l der Lösung auf 1 ml verdünnt (0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5). Freies, nicht rekonstituiertes Opsin wurde durch Titration mit Retinal und den Retinalanalogen bestimmt. Die Rekonstitution wurde mit 200 μ l Zellysat in 1 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 durch Differenzspektroskopie verfolgt.

2.5.2 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten der Retinalanaloge im Chromophor

Die Extinktionskoeffizienten der mit den Retinalanalogen rekonstituierten Chromophore wurde in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.5, bei Raumtemperatur durch vergleichende Titration mit Retinal in der Apomembran und in der isolierten weißen Membran durchgeführt. Die Konzentrationen der Apomembran und der weißen Membran lagen zwischen 4 und 6 μ M. Die Retinale wurden als methanolische Lösungen zutitriert (10^{-3} – 10^{-4} M). In der Sättigung verhalten sich die Extinktionen wie die Extinktionskoeffizienten.

$$\begin{array}{ccc} E_1 & & \epsilon_1 \\ - - & = & - - \\ E_2 & & \epsilon_2 \end{array}$$

Da der Extinktionskoeffizient des Bakteriorhodopsins bekannt

ist (ϵ ; 63000 l M⁻¹ cm⁻¹ Oesterhelt & Hess 1973), läßt sich aus der Gleichung der Extinktionskoeffizient ϵ_2 des Chromophors mit dem Retinalanalogen ermitteln.

2.5.3 Bestimmung der Pumpaktivität der Retinalanalogen in Zellvesikeln

Die Pumpaktivität wurde in Zellvesikeln nach der Methode von Oesterhelt (1982) gemessen. Die Werte wurden durch Vergleich der translozierten Protonen bei 100% Lichtintensität ermittelt. Die Proben wurden mit einer Wolframlampe 250 W unter Verwendung eines Filters (Schott OG 305) bestrahlt.

2.5.4 Autrennung der Membranen im Sucrosegradienten

Zur Bestimmung der Dichte der chromophorenhaltenden Membranen wurde 1 ml der Zellsuspension 45 min bei 80000 g zentrifugiert, der Niederschlag in 500 μ l H₂O suspendiert und auf einen Sucrosegradienten (20-45% w/w, 10 mM /Tris pH 7.5) geschichtet. Nach 14 h Zentrifugation (Kontron TST 41 Ausschwingrotor) mit 200000 g waren die Membranen ihrer Dichte entsprechend aufgetrennt.

2.6 Versuch zur Identifizierung des Bakterioopsinvorläufers im Cytoplasma

2.6.1 Inkubation der Zellen mit CCCP

35 ml Zellkultur des Stamms ET 1001 wurden am 3. Tag des Wachstums mit CCCP in Ethanol versetzt. Die Endkonzentration betrug 0-0.8 μ M. Am 5. Tag wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteine im SDS-Gel analysiert. Die Identifizierung des Bakterioopsins geschah durch Immunreplikatechnik.

2.6.2 Präparation des cytoplasmatischen Überstandes

700 ml Kulturmedium des Stammes ET 1001 wurden am 3. Tag des Wachstums (OD_{600} 0.36) mit CCCP (5.5 μ M) versetzt und 6 h bei 40 °C nachinkubiert. Als Vergleich diente ein Kolben ohne CCCP. Die Zellen wurden geerntet, in 2 ml 0.1 M Tris/HCl pH 7.4 lysiert und 1 h bei 80000 g zentrifugiert.

2.6.3 Gelfiltration des cytoplasmatischen Überstandes

Der Überstand wurde auf einer ACA 44 Säule (2 x 20 cm) chromatographiert. Als Äquilibrations- und Elutionspuffer wurde 0.1 M Tris/HCl pH 7.4, 0.2 M NaCl verwendet. Zum Eichen der Säule dienten Dextran Blau, PM, BSA und Cyt.C. Fraktion 22- 38 wurden mit einer Aminconzelle (LKB, PM 10) eingengt und im SDS-Gel analysiert. Die Identifizierung des Bakterioopsins erfolgte durch Immunreplikatechnik.

2.6.4 Dichtezentrifugation des cytoplasmatischen Überstandes

300 μ l des cytoplasmatischen Überstandes wurden mit 700 μ l Urographin (76%, Scheringwerke) gemischt (Endkonzentration 40%), auf ein Polster von 2 ml 76%igem Urographin gebettet, mit 30.4%igem Urographin in 0.1 M Tris/HCl pH 7.4 überschichtet und 16 h mit 200000 g zentrifugiert (Kontron TST 41 Ausschwingrotor). Als Kontrolle diente eine Mischung von PM und Cyt.C. Um einen empfindlicheren Nachweis der Trennung zu erhalten, wurde radioaktiv markierte PM (0.79 nMol, 69 μ C/mMol) eingesetzt. Nach der Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert und die membranfreie Fraktion gegen 0.1 M Tris/HCl pH 7.4 dialysiert. Die Proteine wurden im SDS-Gel analysiert. Die Identifizierung des Bakterioopsins geschah durch Immunreplikatechnik.

2.7 In-vitro-Translation

2.7.1 Präparation des Rohextrakts

Wurden zur Präparation die Stämme JW-5 und ET 1001 verwendet, erfolgte die Ernte in der späten logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD_{460} von 0.4-0.5. Der Stamm L 33 wurde bereits am 3. Tag bei einer OD_{460} von 0.6-0.7 geerntet (1.8 g Zellnaßgewicht/l Zellkultur). Die zentrifugierten Zellen wurden nach der Methode von Bayley und Griffiths (1968) einmal mit Basalsalz und einmal mit Translationspuffer (0.01 M HEPES pH 7.6, 3.4 M KCl, 0.1 M MgAcetat) gewaschen, anschließend in dem 1.5-fachen Volumen (ml) des Zellnaßgewichts (g) aufgenommen und 4 h gegen den Translationspuffer bei 4°C mit dreimaligem Wechsel des Puffers dialysiert. Während dieses Schrittes lysieren die Zellen vollständig.

Die Suspension wurde 1 h bei 4°C mit 40000 g zentrifugiert. Der Niederschlag besteht aus DNS und Membranen, der Überstand enthält die RNS und die löslichen Proteine, einschließlich der Ribosomen.

Die Proteinbestimmung nach Lowry ergab eine durchschnittliche Konzentration von 18.1 mg/ml.

OD_{260} : 29

OD_{280} : 21.2

OD_{260}/OD_{280} : 1.22

Die Ribosomenkonzentration betrug 0.32 nMol Ribosomen/g Zellen Naßgewicht.

2.7.2 Präparation von freien und membrangebundenen Polysomen

Als Mutante wurde JW-5 verwendet. Die Zellen wurden wie zur Präparation des Rohextrakts geerntet, gewaschen und in 2 ml Translationspuffer suspendiert. Zur Lyse wurden die Zellen mit 50 μ l 4% Na-Desoxycholatlösung versetzt und 1 h bei 0°C stehen gelassen. Der Ansatz wurde geteilt.

Die eine Hälfte wurde 4 h bei 150000 g zentrifugiert und als ribosomenfreier $S_{1,0}$ -Überstand definiert.

Die zweite Hälfte wurde auf einen linearen 7-30%igen Sucrosegradienten in 0.01 M HEPES pH 7.6, 3.4 M KCl, 0.1 M MgAcetat gegeben, der auf ein 2 ml Polster einer 50%igen Rohrzuckerlösung in Translationspuffer geschichtet war. Das Zellysate wurde auf zwei Röhrchen verteilt und 2 h bei 28000 rpm zentrifugiert (Kontron TST 41 Ausschwingrotor).

Nicht lysierte Zellen durchdringen das Polster, DNS, Membranen und membrangebundene Polysomen lagern sich auf dem Polster ab, und die freien Polysomen bandieren im letzten Drittel des Gradienten.

Die Polysomen wurden von oben nach unten durch Einpumpen einer 60% Sucroslösung geerntet. Da die auf dem Polster sitzende Fraktion zu zäh zum Auspumpen war, wurde sie mit einer Pipette abgenommen.

Die polysomenhaltigen Fraktionen wurden 4 h gegen den Translationspuffer dialysiert und anschließend 16 h bei 100000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 100 μ l Translationspuffer suspendiert und zur Translation eingesetzt.

2.7.3 Isolierung der Ribosomen aus dem Rohextrakt.

Der wie unter 2.7.1 hergestellte Rohextrakt wurde 14 h bei 100000 g zentrifugiert. Der Überstand ($S_{1,0}$) wurde portionsweise bei -70°C eingefroren, der Niederschlag in 150 μ l Translationspuffer suspendiert und ebenfalls bei -70°C aufbewahrt. Die Abtrennung der Ribosomen aus dem Rohextrakt wurde durch den Vergleich der Extinktionen bei 260 und 280 nm verfolgt. Der Quotient aus den Extinktionen wurde zur Charakterisierung der Lösungen verwendet.

	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD _{260/280}
Rohextrakt:	29	21.2	1.35
S ₁₀₀ :	12	10.9	1.08
Ribosomen:	246	151.5	1.67

Proteinbestimmung nach Lowry: Rohextrakt: 18.1 mg/ml
 S₁₀₀: 10.7 mg/ml
 Ribosomen: 24.0 mg/ml

Die Ausbeute an Ribosomen/g Zellnaßgewicht betrug 0.32 nMol.

2.7.4 Vorinkubation des Rohextrakts

Rohextrakt	40 ul
Translationsmix	
ohne ³⁵ S-Methionin	170 ul
KCl, ...	30 mg

Die Suspension wurde 3 h bei 37°C inkubiert, anschließend mit ATP (0.12 M), NaGTP (0.012 M), NaPEP (0.12 M) gelöst in Translationspuffer, ³⁵S-Methionin (20 uC; 1440/mMol), mRNS (Fraktion II der Präparation; 0.4-1.2 ug) oder Gesamt-RNS (4 ug) versetzt. Die Endkonzentraion an Mg²⁺ betrug 45 mM.

2.7.5 Micrococcus Nuklease Behandlung des Rohextrakts und des S₁₀₀ Überstandes

Die Micrococcus Nuklease wurde von der Firma P.L. Biochemicals (9000 U/mg) bezogen.

Inkubationsansatz:

	Rohextrakt (OD ml ₂₆₀ : 1.16)	40 ul
oder	S ₁₀₀ (OD ml ₂₆₀ : 0.06)	40 ul
	Micrococcus Nuclease (150000 units/ml in 50 mM Glycin pH 8.2, 5 mM CaCl ₂)	1 ul
	0.5 M CaCl ₂	2 ul
	1 M EGTA	2 ul
	zum Stoppen der Reaktion	

Die Nuclease-Aktivität wurde indirekt durch Präzipitation nicht verdauten Materials bestimmt. Hierzu wurden die Proben nach Inkubation mit 200 ul H₂O versetzt, und die RNS mit den Proteinen des Rohextrakts mit 1 M LiCl und zwei Volumina EtOH gefällt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert, getrocknet, in 1 ml 10 mM Tris pH 7.6 gelöst und bei 260 und 280 und vermessen. Als Kontrolle diente Kalbsthymus DNS (1 ODml) in 10 mM Tris pH 7.6 inkubiert mit 1 Einheit Micrococcus Nuclease und Kalbsthymus DNS (1 ODml) in Translationspuffer inkubiert mit 150 Einheiten Micrococcus Nuclease.

2.7.6 Translation mit dem Zellrohextrakt

Translationsmix nach Bayley und Griffiths (1968)

NaATP (0.12 M)	10 ul
NaGTP (0.012 M)	15 ul
NaPEP (0.12 M)	10 ul

KCL (3.4 M)	
MgAcetat (0.07 M)	70 ul
HEPES (0.1 M pH 7.6)	

(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.6 M),	
NH ₄ Cl (5 M)	40 ul

Aminosäuregemisch ohne Met (2.5 mM)	2 ul
--	------

³⁵ S-Methionin (0.05-20 uCi; 1440 Ci/mMol)	2 ul
--	------

H ₂ O	21 ul
------------------	-------

Rohextrakt	40 ul
KCl, gesamt	30 mg
Translationsmix	170 ul

Die Endkonzentration an Mg²⁺ betrug 40 mM. Das KCl wurde fest dazugegeben, da die Ribosomen zur Stabilität Konzentrationen nahe der Sättigung benötigen (Bayley & Kushner 1964). Die Proben wurden 45 min bei 37°C inkubiert.

2.7.7 Translation mit freien und membrangebundenen Polysomen

Ribosomenlösung	
(OD ₂₆₀ : 10)	20 ul
S ₁₅₀	20 ul
KCl _{gesamt}	30 mg
Translationsmix	170 ul

Die Suspension wurde 45 min bei 37°C inkubiert.

2.7.8 Rekonstitution des Translationssystems

S ₁₀₀	5 ul
Ribosomen	0,5-4 ul
(6-48 pMol)	
Translationspuffer ad	35 ul
Translationsmix	170 ul
KCl _{gesamt}	30 mg

2.7.9 Rekonstitution der tRNS-Beladung im Micrococcus Nuklease behandelten S₁₀₀ Überstand

Die Hefe tRNS wurde von der Firma Boehringer bezogen. Der S₁₀₀ wurde wie unter 2.7.4 beschrieben mit Micrococcus Nuklease behandelt.

S ₁₀₀	40 ul
(OD ₂₆₀ 0.12)	
tRNS (10 mg/ml)	0-12 ul
Translationsmix	149 ul
ohne H ₂ O	
H ₂ O ad	21 ul
KCl _{gesamt}	30 mg

2.7.10 Translation exogener mRNA im homologen System

Der S_{100} Überstand wurde wie unter 2.7.4 beschrieben hergestellt und nach der unter 2.9.4 beschriebenen Methode mit Micrococcus Nuclease behandelt.

S_{100} Nuclease behandelt	40 ul
(OD $_{1260}$: 0.06)	
Ribosomen (20 pMol)	6 ul
mRNA (0.15-1.1 ug) oder	1-10 ul
Gesamt-RNA (1.3-26 ug)	1-10 ul
H ₂ O Endvolumen	18 ul
tRNA (10 mg/ml)	2 ul
Translationsmix	149 ul
ohne H ₂ O	
KCl, ...	30 mg

2.7.11 Quantitative Bestimmung des Einbaus von ^{35}S -Methionin in präzipitierbares Material

Zur quantitativen Bestimmung der radioaktiv markierten Proteine wurden 10 ul des Translationsansatzes in 200 ul 50 mM NaOH 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 1 ml 25% TCA versetzt und zur vollständigen Präzipitation 15 min im Eisbad inkubiert. Die Lösung wurde filtriert (Whatman GF/C, 2.5 cm), der Filter 2 mal mit 5% TCA gewaschen, 15 min bei 60°C getrocknet, mit 6 ml Szintillationslösung (Rotiszint 22; C.Roth K.G.) versetzt und gezählt.

Sollte die Beladung der tRNA mit ^{35}S -Methionin bestimmt werden, wurden die Proben nur mit 25% TCA gefällt, abfiltriert und gezählt.

2.7.12 Vorbereitung der Proben für die SDS-Gelelektrophorese

Der Inkubationsansatz wurde zur Lösung des KCl_s mit 200 µl H₂O und 800 µl 25% TCA versetzt, ins Eisbad gestellt und 10 min bei 9000 g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde 1 mal mit 5% TCA Lösung und 2 mal mit Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 30 µl 10% SDS-Lösung gelöst. Falls die Proben sich nicht lösten, wurde durch ul-weises Zugabe einer 1 N NaOH neutralisiert. Die Proben wurden mit 30 µl Probenpuffer (Lämmler 1970, Steiner 1980) versetzt, 5 min auf 90°C erhitzt und auf das SDS-Gel aufgetragen.

2.8 Anreicherung der mRNA aus Halobacterium halobium

Die Anreicherung wurde nach der Vorschrift von Chang et al (1981) durchgeführt. Die zur Isolierung der RNS benötigten Glasgeräte wurden über Nacht bei 180°C sterilisiert. Alle Lösungen wurden mit autoklavierten H₂O hergestellt und steril filtriert.

Drei Kolben mit 700 ml Zellkultur des Stamms ET 1001 wurden bei einer OD₆₀₀ von 0.5 geerntet (6 g Zellaßgewicht) und mit 60 ml Guanidiniumthiocyanatpuffer (4 M Guanidiniumthiocyanat (Fluka), 0.025 M Natriumcitrat pH 7.0, 0.5% N-Lauroylsarcosin, 0.3% Antifoam A (Sigma), 0.7% 2-Mercaptoethanol) aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde auf ein Polster von 5.7 M CsCl gepuffert mit 0.025 M Natriumacetat pH 5.0 geschichtet (Zelllysate/CsCl- Polster= 3:1) und bei 113000 g für 20 h, 20°C zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen durchdringt die RNS das Polster und schlägt sich am Boden des Zentrifugenrohrchens nieder. Durch rasches Umkippen des Rohrchens wurde die RNS von den restlichen Lösungen getrennt und anschließend durch portionsweises Zugabe von Guanidiniumhydrochloridpuffer (7.5 M Guanidiniumhydrochlorid neutralisiert mit 10 M NaOH, 0.025 M Natriumcitrat, pH 7.0, 5 mM Dithiothreitol) gelöst. Wenn nötig wurden die Proben kurzzeitig auf 60°C erwärmt. Ungeloste Bestandteile wurden durch 10 min Zentrifugation bei 10000 g abgetrennt. Der

überstand wurden durch Zugabe von 0.025 Volumen 1 M Essigsäure auf pH 5 gebracht und die RNS mit 0.5 Volumen Ethanol gefällt. Nach 6 h bei -15 °C wurde das Präzipitat durch Zentrifugation mit 10000 g, 10 min, geerntet, getrocknet und erneut aus der Guanidinhydrochloridlösung ausgefällt. Diesmal wurde die RNS mit Ethanol gewaschen, in sterilem H₂O gelöst und mit 0.1 M Natriumacetat, pH 5.0, und 2 Volumen Ethanol präzipitiert. Zum vollständigen Ausfällen wurde die Suspension über Nacht bei -15°C aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

Die Ausbeute der Gesamt-RNS betrug $600 \text{ OD}_{260} = 24 \text{ mg}$.

Zur Anreicherung der mRNS wurden 200 ODml in 500 µl 20 mM HEPES, pH 7.6, 0.1 M LiCl, 0.5% Natriumdodecylsulfat auf einen linearen Sucrosegradienten (7-30%, w/w, in 20 mM HEPES, pH 7.6, 0.1 M LiCl, 0.5 M Natriumdodecylsulfat) aufgetragen und 20 h mit 113000 g bei 20 °C zentrifugiert (Kontron TST 41 Ausschwingrotor). Die RNS wurde durch Einpumpen einer 50% Sucroslösung von oben geerntet (15 Tropfen/Fraktion). Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und zur Präzipitation der RNS mit Natriumacetat (Endkonzentration 0.1 M, pH 7.5) und 2 Volumen Ethanol versetzt.

Das Gel zeigte, daß die Fraktionen noch 5S RNS enthielten. Die Ausbeute betrug 675 µg RNS aus 6g Zellnaßgewicht; dies entsprach einem Anteil an Gesamt-RNS von 2.8%.

2.9 Analytische Methoden

2.9.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteine wurden wenn nicht anders vermerkt in 9-24%igen Polyacrylamidplattengelen (12x13x0.15 cm) analysiert (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde über Nacht bei 15 mA mit 135 V Spannungsbegrenzung durchgeführt.

Waren die Proteine radioaktiv markiert, wurden die Gele nach der Methode von R.A. Laskey (1975) mit 2,5 Diphenyloxazol (Merck) behandelt, getrocknet und bei - 70°C fluorographiert (Linhardt X-Ray 90).

2.9.2 RNS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der RNS erfolgte durch Elektrophorese in vertikalen 2%igen Agarose/Harnstoffgelen (20x20x0.2 cm) nach der Methode von Tu (1982).

Puffer A:	Citronensäure	0.25 M
	β -Alanin	0.5 M

Puffer B:	Citronensäure	0.25 M
-----------	---------------	--------

Ansatz für 10 ml Lösung:	Agarose	0.2 g
	H ₂ O	2.23 ml
	Harnstoff 9 M	6.67 ml
	Puffer A	0.25 ml
	Puffer B	0.75 ml
	SDS 10 %	0.1 ml

Zur Elektrophorese wurden RNS-Lösung (10-20 ug) mit Formamid (Endkonzentration 75%) versetzt, 10 min auf 65°C erhitzt und mit 2 ul Loening Probenpuffer (2 mg/ml Xylenecyanol, 2 mg/ml Bromphenolblau, 2 mg/ml Orange G, 1 mM EDTA in 50% Sucrose) und 2 ul einer sauren Puffermischung (Puffer A/Puffer B=4/1)

versetzt.

Vor dem Anfärben mit Ethidiumbromid (2.5 ug/ml) wurden die Gele zunächst mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.5 neutralisiert. Die fluoreszierenden Banden wurden mit einem Ilford HP 5 Film unter Verwendung eines Orangefilters (590 nm; Heliopan, Gräfelfing) fotografiert.

2.9.3 Größenbestimmung der Bacterioopsin-mRNS

Zur Größenbestimmung des Bacterioopsin-mRNS wurde die RNS nach der Methode von Carmichael und McMaster (1980) mit Glyoxal denaturiert. Als Größenstandard diente Hind III gespaltene λ -DNS. Die RNS wurde in einem 1.5% Agarosegel bei niedriger Ionenstärke des Gel- und Elektrodenpuffers (0.01 M Natriumphosphat pH 7.0) mit mehrmaligem Wechsel des Elektrodenpuffers aufgetrennt. Das Gel wurde mit Acridin Orange (30 mg/ml) angefärbt und die fluoreszierenden Banden mit einem Rotfilter (OG 400 nm) fotografiert.

Zur Identifizierung des Bakterioopsinmessengers wurde die RNS wie unter (2.10.1) beschrieben auf DBM-Papier übertragen und mit dem radioaktiv markierten, in pBR 322 klonierten Bakterioopsin-gen hybridisiert.

2.9.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach Lowry (1951) mit BSA als Eichprotein durchgeführt.

2.9.5 Bestimmung der Ribosomenkonzentration

Zur Bestimmung der Ribosomenkonzentration wurden die für E. coli ermittelten Werte übernommen. Nach diesen entspricht 1 OD_{ml₂₆₀} 24 pMol Ribosomen (70 S).

2.10 Filterhybridisierung der RNS

2.10.1 Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten RNS

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNS wurde nach der Methode von Tu (1982) mit 2 M Natriumacetat als Transferpuffer auf DBM-Papier übertragen, das nach der Vorschrift von Alwine et al. (1979) hergestellt wurde. Das zur Erstellung des DBM-Papiers benötigte N-(3-Nitrobenzyloxymethyl)-Pyridiniumchlorid wurde von der Firma Sigma bezogen. War die RNS durch Glyoxal denaturiert, wurde das Gel vor dem Transfer 5 min in 1 N NaOH gebadet. Der Transfer wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt.

2.10.2 Hybridisierung der RNS

Vorhybridisierungspuffer:	Formamid	5 ml
	20xSSC	2.5 ml
	10% SDS	50 μ l
	Kalbsthymus DNS,	1.3 ml
	beschallt	
	(10 mg/ml)	

Das Papier mit der transferierten RNS wurde 24 h bei 42°C mit dem Vorhybridisierungspuffer (50–100 μ l/cm²) inkubiert. Nach der Vorinkubation wurde der Puffer durch den Hybridisierungspuffer ersetzt, der außer den Bestandteilen des Vorhybridisierungspuffers 1 ml der radioaktiv markierten Probe enthielt. Für jede Spur wurden 1–2 $\times 10^6$ cpm (17.6 $\times 10^6$ cpm/0.5 μ g DNS) eingesetzt. Das Papier wurde 24 h bei 42°C inkubiert.

Waschpuffer:	20xSSC	50 ml
	0.2 M EDTA	
	pH 7.8–8	4 ml
	10% SDS	20 ml
	H ₂ O	926 ml

Das Papier wurde so lange bei 42°C gewaschen, bis in 10 ml des Waschpuffers weniger als 100 cpm gemessen werden konnten. Das Papier wurde in Cellophan eingeschweißt und

autoradiographiert (Linhardt X-Ray 90).

2.11 Nicktranslation

Zur Nicktranslation wurde das in pBR 322 klonierte Bakterioopsin-gen eingesetzt, das freundlicherweise von H. Vogelsang-Wencke zur Verfügung gestellt wurde. Die Reaktion wurde nach Rigby et al (1977) durchgeführt.

5x Nicktranslationspuffer: Tris/HCl pH 7,5	0,5 M
MgCl ₂	50 mM
dCTP	500 µM
dGTP	500 µM
dTTP	500 µM

0,5 µg der über einen Sucrosegradienten gereinigten DNS wurden in 20 µl des Nicktranslationspuffers und 75 µl H₂O gelöst, mit 50 uCi ³²P-dATP (3000/mMol) und 5 µl (25 U) E.coli DNS-Polymerase I für die Nicktranslation versetzt und 3 h bei 18°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 µl 0,5 M EDTA pH 8 gestoppt, und die DNS durch Chromatographie mit einer Sephadex G 50 Säule (10x1 cm) in TE-Puffer (Tris/HCl pH 7,5 EDTA 1mM) gereinigt. Unter diesen Bedingungen entsprach die Markierung einem Wert von 17,6x10⁴ cpm/0,5 µg DNS.

2.12 Immunologische Methoden

2.12.1 Immunisierung der Kaninchen

10-50 µg elektrophoretisch gereinigtes Bakterioopsin in 0,1 M Tris/HCl pH 8,1, 0,1% SDS wurde mit 500 µl physiologischer Kochsalzlösung (Fresenius, Bad Homburg) und 500 µl komplettem Freund'schem Adjuvans versetzt (Behringwerke Marburg) und so lange in einer Spritze

aufgezogen, bis aus der viskosen Suspension ein fester Schaum entstanden war. Das Antigen wurde subcutan in den Rücken des Kaninchens gespritzt. Nach 1 und 4 Wochen wurde die Injektion wiederholt, zur Suspension wurde jedoch das inkomplette Freund'sche Adjuvans (Behringwerke Marburg) verwendet. Nach 6 Wochen wurde zum ersten Mal der Titer des Plasmas bestimmt. Die Injektionen wurden so lange wiederholt, bis ein Titer von 1:100 bis 1:500 erreicht worden war.

2.12.2 Gewinnung des Serums

Das Blut wurde durch Legen einer Nadel in die Ohrvene des Kaninchens gewonnen. Je nach Konstitution des Kaninchens konnten bis zu 30 ml Blut gewonnen werden. Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend 20 min mit 10000 g Zentrifugiert. Das Serum wurde vom Blutkuchen abdekantiert und portionsweise bei -15°C eingefroren. Die Spezifität wurde durch Immunreplikatechnik nachgewiesen (Abb.)

2.12.3 Elektrophoretischer Transfer der Proteine auf Nitrocellulose

Die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach der Methode von Burnette (1981) auf Nitrocellulose (Schleicher und Schüll) übertragen. Der Transfer wurde in 25 mM Tris 192 mM Glycin, pH 8.1 und 20% Methanol 4 h bei 0.3 A und 30 V durchgeführt.

2.12.4 Immunreplikatechnik

Die Nitrocellulose der transferierten Proteine wurde zur Absättigung 1 h bei 37°C mit 3% BSA in Inkubationspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.3, 0.15 M NaCl) leicht geschüttelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 1:100 in Inkubationspuffer verdünntem Serum für 1 h bei 37°C. Die gebundenen Antikörper wurden entweder mit Fluorescein markierten Antikörpern (Sigma) oder durch Peroxidase markierte Antikörper (H.Tobwin et al. 1979) angefärbt.

Die FITC Markierung erfolgte mit 1:60 verdünnten (Inkubationspuffer) Ziege anti Kaninchen IgG bei 37°C. Nach 1 h wurde die Nitrocellulose mit Inkubationspuffer mehrmals gewaschen und unter Verwendung eines Gelbfilters bei 366 nm mit einem HP 5 Film photographiert.

Zur Färbung der Peroxidase markierten Antikörper (Sigma 1:1000 in Inkubationspuffer) wurde die Nitrocellulose nach 1 stündiger Inkubation bei 37°C mit einer Lösung von 10 mM Tris/HCl, pH 7.3, 2.5% einer 1%igen methanolischen o-Dianisidin-Lösung, 0.1% einer 3%igen H₂O₂-Lösung versetzt und 0.5 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die angefärbten Proteine wurden mit einem Agfaortho 25 Film photographiert.

2.12.5 Bestimmung des Titers

5 µg des elektrophoretisch gereinigten Antigens wurden mit Hilfe einer Lochplatte (Schleicher und Schüll) auf Nitrocellulose (Schleicher und Schüll) pipettiert und anschließend 1 h bei 37°C mit 3% BSA in 0.15 NaCl, 10 mM Tris pH 7.3 (Inkubationspuffer) inkubiert. Nach der Absättigung der Nitrocellulose wurde das Serum in Verdünnungen 1:10 bis 1: 1000 im Inkubationspuffer auf die Nitrocellulose pipettiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Anfärbung erfolgte wie unter 2.12.4 beschrieben mit peroxidase markierten Antikörpern.

D Ergebnisse

1. In vivo Versuche zur Biosynthese des Bakterioopsins

1.1 Versuche zur Regulation der Bakterioopsin Synthese

1.1.1 Charakterisierung der Mutante JW-5

Die Mutante JW-5 ist vom Stamm ET 1001 durch Bestrahlung mit UV Licht abgeleitet worden. Phänotypisch unterscheiden sich die Zellen nur durch die Abwesenheit des Bakteriorhodopsins, dessen Bildung durch einen Block im Retinalbiosyntheseweg verhindert ist. Dadurch fehlt der Mutante auch die Purpurmembran, die sich von den anderen Membranen durch ihre ungewöhnlich hohe Dichte ($\delta = 1.18 \text{ g cm}^{-3}$) unterscheidet. Die Zellen synthetisieren Bakterioopsin, jedoch in geringerer Konzentration. Das Bakterioopsin lagert sich in die weiße Membran ein, die im Rohrzuckergradientengradienten bei einer Dichte von $1.13\text{--}1.15 \text{ (g cm}^{-3}\text{)}$ bandiert (Abb.4). Die Membran enthält neben Bakterioopsin noch andere Proteine, das Bakterioopsin konzentriert sich jedoch im Rohrzuckergradienten bei einer Dichte von $1.15 \text{ (g cm}^{-3}\text{)}$ (Abb.4 und 5).

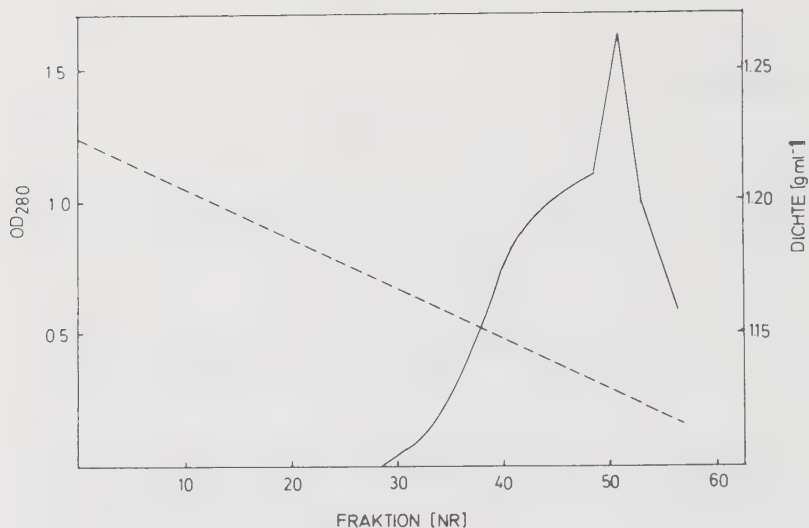


Abb. 4 Rohrzuckergradient (20-45% in 10 mM Tris/HCl pH 7.5) der Gesamt-membranfraktion des Stammes JW-5.

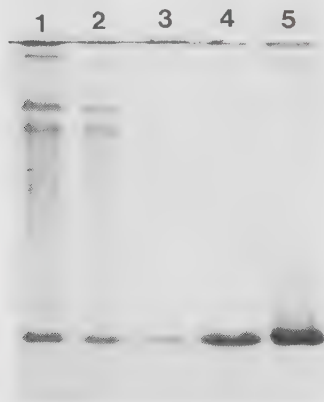


Abb. 5 Isolierung der weißen Membran. 1, Gesamt-membranfraktion; 2, Fraktion 41-55 des Rohrzuckergradienten; 3, Fraktion 40-35; 4, Fraktion 30-34; 5, Bakteriorhodopsin aus Purpurmembran

In der weißen bildet das Bakterioopsin kein zweidimensionales kristallines Gitter. In vitro kann wie unter C 2.4 beschrieben Bakterioopsin durch Rekonstitution mit Retinal und Inkubation in Basalsatz kristallisiert werden (Abb.7). Für die Kristallinität ist die Dichte der Membran nicht entscheidend. Die Dichte der Membran kann aber ebenfalls wie unter C 2.4 beschrieben in vitro durch Inkubation mit 1% n-Octyl- β -D-glycopyranosid (34 mM, 2 μ M Bakterioopsin) verändert werden (Abb.6). Die Detergenskonzentration kann zwischen 0.5 und 1% variiert werden; unter 0.5% wird die Dichte nicht verändert, oberhalb 1% wird die Membran aufgelöst.

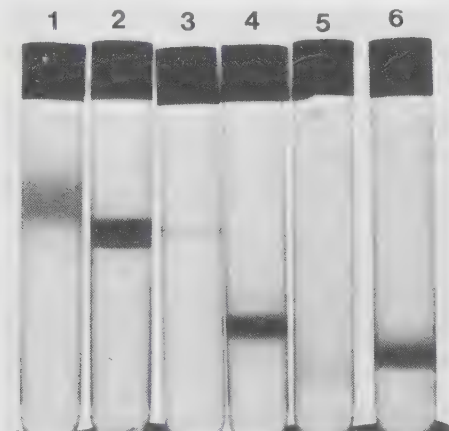


Abb.6 Rohruckergradient (20-45% w/w in 10 mM Tris pH 7.5) der weißen Membran (6.1 nMol B0). 1, mit 25 μ M Retinal, inkubiert in 20 mM Na-Acetat pH 7.0; 2, mit 25 μ M Retinal, inkubiert in BS; 3, ohne Retinal, inkubiert in BS; 4, Probe 2 nach Inkubation in 1% n-Octyl- β -D-glycopyranosid; 5, Probe 3 nach Inkubation in 1% n-Octyl- β -D-glycopyranosidsid; 6, PM. Die Proben wurden 15 h bei 40°C inkubiert. Die Schwärzung entsteht durch rekonstituiertes B0.

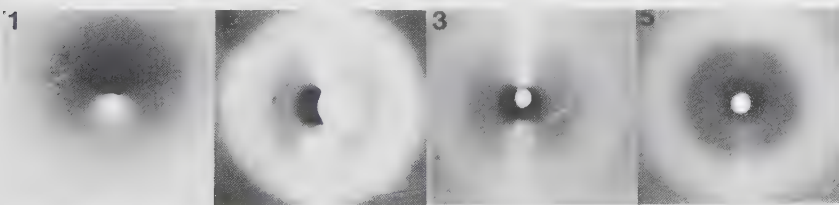


Abb.7 Röntgenbeugungsmuster der weißen Membran. Proben 1,2,3 und 5 des Sucrosegradienten. Abstand der Probe zum Film 10 cm, Expositionszeit 36 h.

Die Analyse des Röntgenbeugungsmusters zeigt (Abb.8). daß die Ordnung der Proteine der in vitro kristallisierten Membran anders ist als in der Purpurmembran aus ET 1001, bei der sich eine Gitterkonstante von 63 Å errechnen läßt (Literaturwert 62.7 Å: Henderson 1975). Die Auflösung des Röntgenbeugungsmusters der in vitro kristallisierten Membran ist zu gering um die Gitterkonstante zu errechnen. Diese Ergebnisse wurden teilweise durch die Arbeiten von Hiraki et al (1981) bestätigt. Bei diesen Arbeiten wurde rekonstituierte Braune Membran aus "Nicotinzellen" verwendet. Im Unterschied zu dem oben beschriebenen Ergebnis, kann durch diese Experimente spontane Kristallisation durch Zugabe von Retinal nachgewiesen werden. Für die das entstehende Gitter wurde ein Konstante von 63 Å ermittelt.

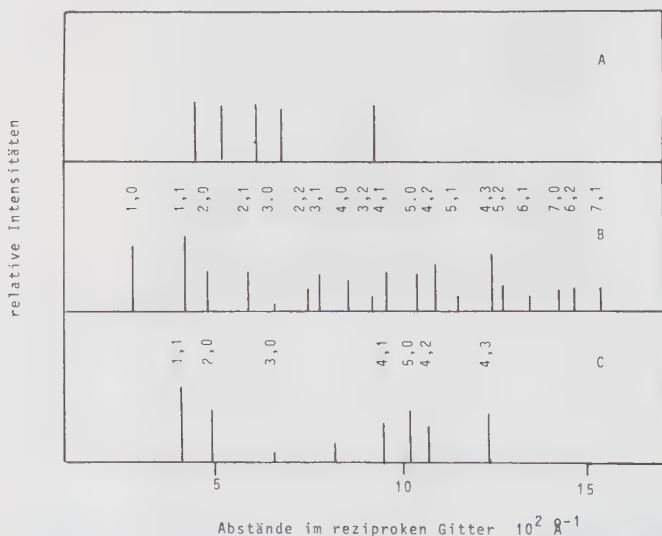


Abb.8 Vergleich der Abstände im reziproken Gitter. **A** In vitro kristallisierte WM (rekonstituiert mit Retinal, inkubiert in BS für 15 h, 40°C; **B** PM nach Henderson (1975); **C** PM aus ET 1001

Diese Ergebnisse widersprechen dem von M.Sumper entwickelten Modell (Sumper et al. 1976), das die Kristallisation zur Purpurmembra n als energieabhängigen Schritt darstellte. Die von M.Sumper durchgeführten Experimente konnten mit dem Stamm JW-5 nicht reproduziert werden. Die weiße Membran kristallisierte in-vivo zur Purpurmembra n, sobald Retinal angeboten wurde. Dieser Prozeß ließ sich auch nicht mit CCCP verhindern. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich vermutlich durch den relativ hohen Bakterioopsingehalt des Stammes JW-5 erklären.

Durch Zugabe von Retinal zum Wachstumsmedium wird der Mutationsdefekt des Stammes JW-5 aufgehoben. Phanotypisch besteht dann zwischen JW-5 und ET 1001 kein Unterschied mehr. Damit schien mit dieser Mutante ein geeignetes System gefunden zu sein, den Einfluß des Retinals auf die Biosynthese des Bakterioopsins zu untersuchen.

1.1.2 Wachstum des Stammes JW-5 mit Retinal

Zur Bestimmung des B0-gehaltes wurden je 35 ml Medium mit ET 1001, JW-5 und JW-5/Retinal angeimpft. Die Retinalzugabe erfolgte wie unter C 2.5 beschrieben.

Die Zellen wurden am 5. Tag geerntet. Der B0-gehalt der Gesamt-membra nfraktion wurde durch Rekonstitution des Opsins zum Rhodopsin bestimmt (C 2.3.1). Die Proteinkonzentration wurde nach Lowry (C 2.9.4) bestimmt. Tabelle 1 faßt das Ergebnis des Versuches zusammen.

Tab.1

	OD ₅₇₈	mg Protein/ml	nMol Opsin/ mg Protein
ET 1001	1.5	4.3	1.66
JW-5/Retinal	2.1	5.6	1.7
JW-5	1.18	4.1	0.39

Dies entspricht unter diesen Wachstumsbedingungen einer Stimulierung der Opsinsynthese durch Retinal um den Faktor von 4.2.

Der Wachstumsversuch ließ zwei mögliche Erklärungen zu:

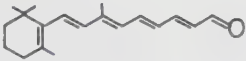
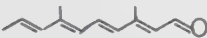
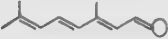
- (1) Es ist das Retinal selbst, das die Synthese des Bakterioopsins stimuliert
- (2) freies, nicht rekonstituiertes Bakterioopsin inhibiert seine eigene Synthese.

Die gleichen Fragen stellten sich auch mit Zellen, die in Gegenwart von Nicotin gewachsen waren. M.Sumper interpretierte die Tatsache, daß auch bei Blockierung der Retinalsynthese durch Nicotin noch Bakterioopsin synthetisiert wird als Hinweis auf eine Produktinhibierung durch Bakterioopsin (Sumper & Herrmann 1976). Wurde 4-Ketoretinal als Konkurrenz zum natürlichen Retinal während des Wachstums zu den Zellen gegeben, wurde das Bakterioopsin vom Retinalanalog weggefangen und die Retinalsynthese blockiert. Die Bakterioopsinkonzentration erreichte unter diesen Bedingungen den natürlichen Gehalt. Damit schien ausgeschlossen, daß Retinal zur Synthese des BO notwendig ist, ungeklärt blieb jedoch ein möglicher Einfluß auf das Ausmaß der Synthese. Mit dem Stamm JW-5 stand eine Mutante zur Verfügung, die die Wachstumsversuche unter physiolo-

gischen Bedingungen ohne Nicotin erlaubte. Um die hypothetische stimulierende Wirkung des Retinals zu untersuchen, wurden verkürzte Retinalanaloge eingesetzt, deren chromphorbildende Eigenschaften sich deutlich von denen des Retinals unterscheiden (Tab.2). Da manche Retinalanaloge die Bildung der Purpurmembraan verhindern, muß bei dieser Hypothese noch eine Inhibierung der Bakterioopsinsynthese durch nicht kristallines Bakteriorhodopsin in Betracht gezogen werden.

1.1.3 Wachstum des Stammes JW-5 mit Retinalanalogen

Um den Effekt des Retinals zu untersuchen, wurden folgende Retinalanaloge in Wachstumsversuchen eingesetzt.

- | | | |
|-----|---|-------------------------------------|
| (1) |  | 13-Desmethyl-retinal |
| (2) |  | 3,7-Dimethyl-deca-2,4,6,8-tetraenal |
| (3) |  | 3,7-Dimethyl-octa-2,4,6-trienal |

Verbindung (1) und (2) wurden von W. Schlude hergestellt, Verbindung (3) von W.Gärtner synthetisiert. Die Extinktionskoeffizienten der Chromophore wurden wie unter C 2.5.2 beschrieben durch vergleichende Titration mit Retinal in der weißen Membran und in der Apomembraan bestimmt. Als Apomembraan wird eine durch Licht in Gegenwart von NH_2OH gebleichte Purpurmembraan bezeichnet. Durch Zugabe von Retinal oder Retinalanalogen kann der Chromophor rekonstituiert werden. Die Eigenschaften der Verbindungen (1-3) im Chromophor im Vergleich zu Retinal sind in Tabelle 2 aufgelistet.

	λ_{max} nm	ϵ (Mol ⁻¹ cm ⁻¹ l)	Pumpaktivität
Retinal	568	63000	100%
(1)	565*	60000	6*
(2)	448	32000	44%
(3)	410	28000	3%

Die mit * versehenen Werte sind aus der Literatur entnommen (Gartner & al. 1983).

Zu 200 ml Medium wurden am 2., 3. und 4. Tag des Wachstums je 20 nMol des Retinalanalogen zugegeben. Als Kontrolle diente Retinal. Die Zellen wurden am 5. Tag geerntet und in 200 ml H₂O lysiert. Die quantitative Bestimmung des Gehaltes an BR und Bakteriorhodopsinanalogen in den Zellen erfolgte wie unter C 2.5.1 beschrieben durch Messen der Chromophorkonzentration. Hierbei wurden die Extinktionskoeffizienten der Retinalanaloge im Protein berücksichtigt. Bakterioopsin in den Zellen wurde durch Rekonstitution des freien Opsins mit Retinal bestimmt. Da bei den BR-analogen nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die Retinalanaloge durch Retinal aus dem Protein verdrängt wurden, wurde in einem zusätzlichen Experiment Retinal durch die jeweiligen Retinalanaloge ersetzt. Tabelle 3 gibt das Ergebnis des Versuchs wider.

Tabelle 3

	-	Retinal	(1)	(2)	(3)
mgProtein/ml	23.1	27.09	23.1	25.9	21.3
nMol Chromophor/ mg Protein	-	2.61	1.14	2.81	0.92
Rekonstitution mit Retinal (nMol Opsin/ mg Protein)	0.9	-	0.59	1.27	2.16
Rekonstitution mit Retinalanalog (nMol Opsin/ mg Protein)	-	-	0.52	0.82	1.77
Opsin gesamt (nMol/mg Protein)	0.9	2.61	1.66	3.63	2.69
Dichte der Membran (g ^{cm} ⁻³)	1.18	1.18	1.18	1.18/ 1.15	1.13- 1.15
Kristallinität	-	+	+	+/-	-

Das Ergebnis des Versuchs läßt sich folgendermaßen interpretieren:

Die Konzentration der Bakteriorhodopsinanaloge zum Zeitpunkt der Ernte ist unterschiedlich. Verbindung (2) unterscheidet sich von der Kontrolle nur geringfügig, die Modifikationen der Verbindungen (1) und (3) beeinflussen die Chromophorkonzentration. Die Konzentration ist um den Faktor 2.3-3 geringer.

Um zu prüfen, ob die Chromophorkonzentration die tatsächliche Opsinkonzentration widerspiegelt, wurden die Zellysate nachträglich mit Retinal versetzt. Für die Zellen, die ohne Retinal gewachsen waren, wurde ein Wert von 0.9 nMol Opsin/mg Protein ermittelt. Daraus ergab sich unter diesen Wachstumsbedingungen eine Stimulierung durch Retinal um den Faktor 3. Auch in den mit den Retinalanalogen gewachsenen Zellen ließ sich noch freies Opsin nachweisen. Im Zellysat der Verbindung (1) konnte noch 0.59 nMol/mg Protein, im Zellysat der Verbindung (2) noch 1.57 nMol/mg Protein und im Zellysat der Verbindung (3) noch 2.17 nMol/mg Protein rekonstituiert werden.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß das Retinal die modifizierten Verbindungen aus dem Protein verdrängt und damit eine falsche Opsinkonzentration vorgetäuscht wird, wurde der Versuch mit den jeweiligen Retinalanalogen wiederholt. Die Werte zeigen, daß die Verbindung (1) fest gebunden ist, bei den Verbindungen (2) und (3) tatsächlich Verdrängungsreaktionen stattfinden. Da nur diese Werte das freie Opsin angeben, wurden diese mit den ursprünglich ermittelten Werten zur Endkonzentration des Bakterioopsins addiert.

Danach ergibt sich folgendes Bild:

Verbindung (1) liegt mit einem Endwert von 1.66 deutlich unter dem Kontrollwert der mit Retinal gewachsenen Zellen und den anderen Analogen. Das Fehlen der 13-Methylgruppe beeinflusst die Synthese des Bakterioopsins. Die Gesamtkonzentrationen der Verbindung (3) erreicht mit dem Wert von 2.7 nMol Opsin/mg Protein den der Kontrolle mit Retinal. Der mit der Verbindung (2) erreichte Wert von 3.6 nMol/mg Protein übersteigt sogar den Kontrollwert. Die Verkürzungen des Retinals scheinen das Ausmaß der Synthese nicht zu beeinträchtigen.

Das BR-analog (1) war die einzige Verbindung, die wie die

Purpurmembran eine Dichte von $1.18 \text{ (g cm}^{-3}\text{)}$ aufwies. Die Membranen, die die BR-analogen (2) enthielten waren aufgespalten, und der Chromophor der Verbindung (3) befand sich ausschließlich in Höhe der weißen Membran. Die Untersuchungen zur Kristallinität entsprachen diesem Ergebnis. Die Membran (1) war kristallin, Membran (2) ebenfalls und Membran (3) nicht.

Nach diesen Ergebnissen ist eine Kontrolle der Bakterioopsinsynthese durch nicht kristallines Bakteriorhodopsin ausgeschlossen. Obwohl der Chromophor der Verbindung (1) ausschließlich in der kristallinen Membran gefunden wurde, konnte die Opsinsynthese nur um den Faktor von 1,8 verstärkt werden. Diese Aussage wird durch die Verbindungen (2) und (3) bestätigt. Die Membran mit des Chromophors (3) ist nicht kristallin; trotzdem wird mit der Bakterioopsinkonzentration der Wert der Kontrolle erreicht. Die Membran der Verbindung (2) ist nur teilweise kristallin, aber auch hier wird die Synthese dadurch nicht beeinträchtigt.

Auch das freie Opsin kann nach diesen Ergebnissen seine eigene Synthese nicht kontrollieren. Bei keiner Verbindung korreliert die Konzentration freien, nicht rekonstituierten Opsins mit der Gesamt-opsinkonzentration. Bei den Retinalanalogen (2) und (3) liegt bei hoher Gesamt-opsinkonzentration noch viel freies Opsin vor. Durch das Analog (3) werden sogar nur 30% des Bakterioopsins abgesättigt. Diese Aussage wird durch das Retinal (1) bestätigt. Hier wird bei vergleichsweise geringer Konzentration freien Opsins eine eingeschränkte Bakterioopsinsynthese gefunden.

Demnach kann es nur das Retinal ein, das die Synthese des Bakterioopsins stimuliert. Die Position 13 scheint für die stimulierende Wirkung wichtig zu sein, die Verkürzung des Retinals um den Cyclohexenring beeinträchtigt die Synthese nicht. Bei Vergleich der Werte der Verbindungen (2) und (3), macht sich durch die weitere Verkürzung um ein Doppelbindung

ein Einfluß auf die Synthese bemerkbar. Aber auch hier wird immer noch der Wert der Kontrolle mit Retinal erreicht.

Diese Ergebnisse widersprechen dem von M.Sumper entwickelten Modell, nach dem freies Bakterioopsin seine eigene Synthese hemmt. Sie reduzieren dieses Modell auf die Aussage, daß das Retinal nicht die Synthese anschaltet. Retinal beeinflusst nur das Ausmaß der Synthese. Es bleibt zu untersuchen, ob die Synthese auf der Transkriptions- oder Translationsebene reguliert wird, und wie das Retinal auf molekularer Ebene wirkt.

1.2 Suche nach dem Vorläufer im Cytoplasma

Bislang ist es nicht gelungen, den Vorläufer des Bakterioopsins in vivo in intakten Zellen zu markieren. In Spheroplasten konnte das Protein zwar als 1000 Dalton größeres, in der Membran befindliches Protein identifiziert werden (Dellweg & Sumper 1980; Seehra & Khorana 1984), aber die Prozessierung zum reifen Protein ließ sich nicht verfolgen. Auch nach Regeneration der Spheroplasten zu intakten Zellen, konnte der Vorläufer nicht mehr ins reife Protein überführt werden (Seehra & Khorana 1984). Für diese Ergebnis sind mehrere Ursachen denkbar:

- (1) Die Prozessierung verläuft cotranslational. Noch während der Synthese wird das Protein in die Membran eingelagert und die Anfangssequenz von der Protease abgeschnitten.
- (2) Die Prozessierung verläuft posttranslational, ist jedoch so schnell, daß man sie in vivo nicht verfolgen kann.
- (3) Bei dem 1000 Dalton größeren Protein handelt es sich nicht um den Vorläufer, wie er im Cytoplasma vorliegt.

Der Nachweis für einen posttranslationalen Prozessierungsmechanismus ist eine lösliche, cytoplasmatische Vorstufe des Membranproteins. Diese konnten zum Beispiel bei kernkodierten, mitochondrialen Membranproteinen und dem Hüllprotein des prokaryontischen Phagen M 13 gefunden werden. (Zimmermann & Neupert 1980; Reid & Schatz 1982b; Ito et al. 1980). Da die Integration des Proteins in die Membran durch CCCP verhindert werden kann, wie am Beispiel der β -Untereinheit der F_1 -ATPase bei Hefe gezeigt werden konnte, lassen sich die Vorläufer im Cytoplasma akkumulieren (Reid & Schatz 1982b;). Da anders als Halobakterien Hefen durch Glykolyse ATP synthetisieren können, und so die Zerstörung des Membranpotentials sich nicht sofort auf den Energiehaushalt auswirkt, war es fraglich, ob sich die Versuche auf Halobakterien übertragen ließen. Durch den folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob sich im Cytoplasma eine lösliche Vorstufe des Bakterioopsins nachweisen läßt, und ob durch CCCP dieser Vorläufer im Cytoplasma angereichert werden kann.

1.2.1 Einfluß des CCCPs auf das Wachstum der Zellen und die Synthese des Bakterioopsins

Um den Einfluß des CCCPs zu testen wurden die Zellen nach drei Tagen Wachstum wie unter C 2.6.1 beschrieben mit steigenden Konzentrationen von CCCP (0- 8 μ M) versetzt und unter gleichen Bedingungen weitergeschüttelt. In Tabelle 4 sind die Trübungsdaten vor und nach CCCP-Zugabe dargestellt. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und durch SDS-Gelelektrophorese analysiert. Bakterioopsin und Bakterioopsin verwandte Proteine wurden durch Immunreplikatechnik identifiziert. Der 'Westernblot' (Abb.9) zeigte eine Aufspaltung des Bakterioopsins in drei Banden in Abhängigkeit von der CCCP-Konzentration. Bei 5 μ M wurde die Aufspaltung am deutlichsten. Zusätzlich wurden noch größere Proteine mit dem Bakterioopsin-antikörper markiert.

Tab.4

M CCCP	0	2	3	4	5	6	7	8
OD ₅₇₈								
3.Tag	0.65	0.63	0.60	0.70	0.54	0.63	0.71	0.65
4.Tag	0.97	0.80	0.72	0.77	0.55	0.71	0.80	0.73
5.Tag	1.1	0.91	0.73	0.75	0.51	0.65	0.76	0.67

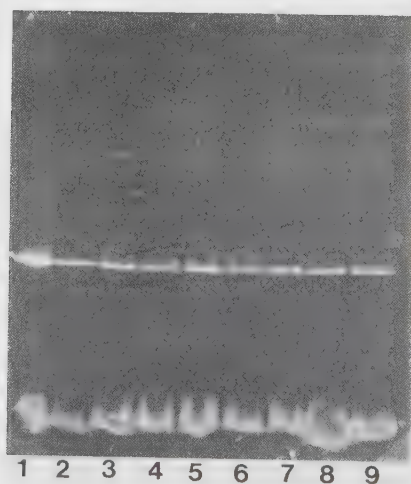


Abb.9 Einfluß von CCCP auf die Synthese des Bakterioopsins im Stamm ET 1001. Die Proteine des Zellysat wurden im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit BR-Kaninchen Antiserum und FITC markiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG inkubiert. 1, Bakterioopsin aus der PM; 2, Zellysat; 3-9, Zellysat nach Inkubation mit 2-8 μ M CCCP.

1.2.2 Versuch zur Identifizierung des Bakterioopsins oder verwandten Proteinen im Cytoplasma

Um den beobachteten CCCP-Effekt im Sinne eines posttranslationalen Prozessierungsmechanismus deuten zu können, mußten die Bakterioopsin verwandten Proteine im Cytoplasma nachgewiesen werden. Dazu mußte das Zellysat vollständig von Membranen befreit werden. Es wurden zwei Methoden angewendet, die Membranen quantitativ abzutrennen.

a Reinigung des Zellysats durch Gelfiltration

Die Zellen wurden wie unter C 2.6.1 und 2.6.2 beschrieben mit CCCP inkubiert, geerntet und lysiert. Das Zellysat wurde zur ersten Reinigung hochtourig zentrifugiert und anschließend auf einer ACA 44 Säule chromatographiert (C 2.6.3). ACA 44 trennt im Molekularbereich von 10 - 100 kD auf, höhermolekulare Proteine und vor allem im Zellysat verbliebene Membranfetzen eluieren im Ausschlußvolumen der Säule. Als Elutionspuffer wurde 10 mM Tris/HCl, 0.2 M NaCl pH 7.4 verwendet. Zum Eichen der Säule dienten Dextran blau, PM, BSA und Cyt.C. Abb.10 zeigt das Elutionsprofil der Säule.

Fraktion 22-38 wurden in einer Amiconzelle eingeeengt und auf das SDS- Gel aufgetragen. Bakterioopsin und mit Bakterioopsin verwandte Proteine sollten durch Immunreplikatechnik angefärbt werden. Im SDS Gel (Abb.11a) sieht man, daß durch die Gelfiltration Proteine größer als 68000 abgetrennt wurden. Im 'Western blot' (Abb.11b) sieht man Bakterioopsin als einziges Protein, das mit dem Antikörper reagiert. Die im vorigen Experiment beobachteten drei Banden des Bakterioopsin tauchen im Zellysat nicht auf. Man sieht keinen Effekt des CCCPs.

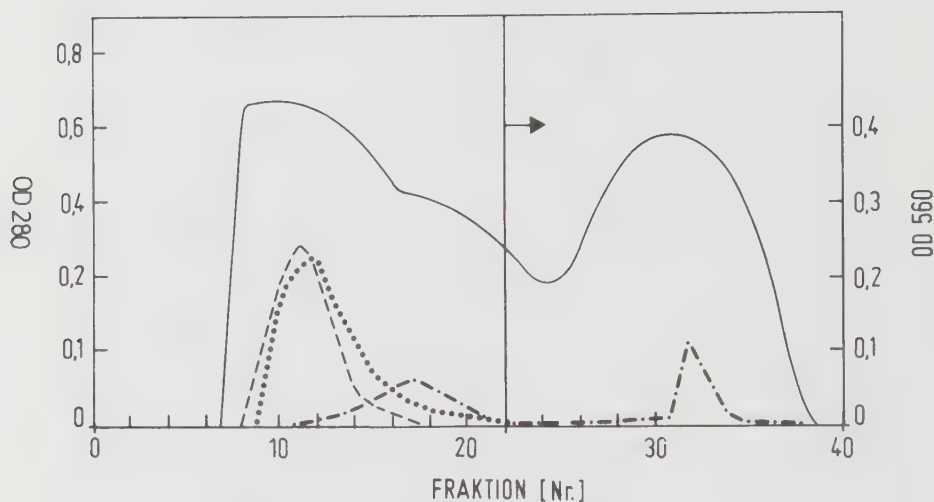


Abb.10 Gelfiltration (ACA 44) des cytoplasmatischen Überstandes. — cytoplasmatischer Überstand; PM; --- Dextran Blau; -.-.- BSA, Cyt.C

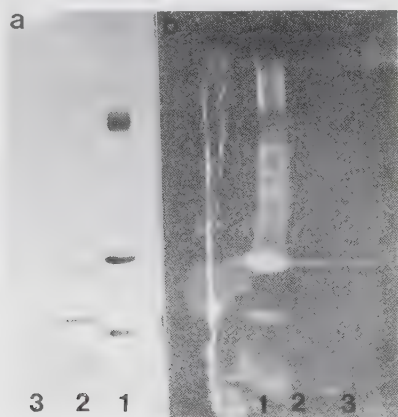


Abb.11a SDS-Gel des gelfiltrierten cytoplasmatischen Überstandes. 1, Zellysat nach Inkubation mit 5 μ M CCCP; 2, Zellysat; 3, BSA, B₀, Cyt.C; **b** Western-Blot des SDS-Gels.

b Dichte-zentrifugation des cytoplasmatischen Überstandes
 Um dieses Ergebnis zu untermauern, wurde die Dichte-zentrifugation als zweite Methode zur Abtrennung von Membranen angewendet (C 2.6.2). Da Proteine eine größere Dichte als Membranen haben, durch ihre Größe jedoch nur langsam in den Bereich der eigenen Dichte zentrifugieren, wurden die Bedingungen so gewählt, daß die Proteine und Membranen im Dichtebereich der Proteine aufgetragen und die Membranen durch Auftreiben in den Bereich eigener Dichte zentrifugiert wurden. Als Träger wurde Urographin verwendet, das unverdünnt eine Dichte von $1.3 \text{ (g cm}^{-3}\text{)}$ erreicht. Das Lysat wurde wie unter C 2.6.2 beschrieben vorbereitet. 300 μl des cytoplasmatischen Überstandes wurden mit 700 μl Urographin gemischt ($\delta=1.21 \text{ g cm}^{-3}$) und in einem TST 41 Röhrchen auf ein Polster von 2 ml 76%igem ($\delta=1.3 \text{ g cm}^{-3}$) Urographin gebettet, mit 30.4%igem Urographin in 0.1 M Tris/HCl pH 7.4 ($\delta=1.15 \text{ g cm}^{-3}$) überschichtet und 16 h bei 28000 rpm zentrifugiert. Als Kontrolle diente eine Mischung aus PM und Cyt.C., deren Trennung in Abb.12 dargestellt ist.

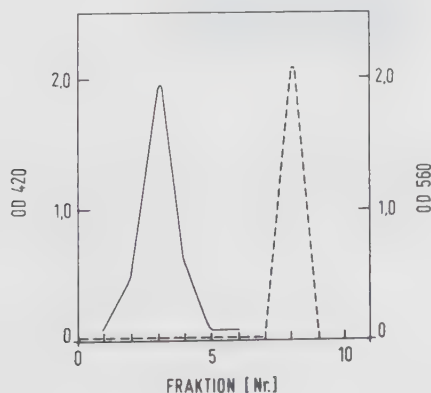


Abb.12 Trennung von PM und Cyt.C durch Dichte-zentrifugation im Urographin Stufengradienten (76%, 40%, 30%). — Cyt.C:
 --- PM

Durch Immunreplikatechnik (Abb.13) wurde nachgewiesen, daß nach der Zentrifugation im Dichtebereich des Cyt.C kein Bakterioopsin mehr zu finden war.

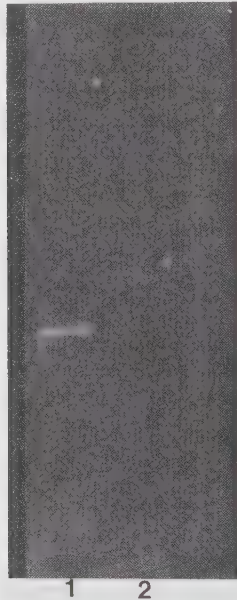


Abb.13 'Western-Blot'. Die Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit Bakterioopsin-Antikörpern inkubiert. Die Anfärbung erfolgte mit FITC markiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG. 1, Bakterioopsin aus der PM; 2, Fraktion 1-5 des Urographin Stufengradienten.

Nach der Zentrifugation wurde die membranfreie Fraktion des Gradienten gegen 0.1 M Tris/HCl pH 7.4 dialysiert und auf das SDS-Gel aufgetragen. Auf dem 'Western blot' (Abb.14) sieht man wieder nur Bakterioopsin als einziges Protein, die Aufspaltung des Bakterioopsins in drei Banden hat also nichts mit der Akkumulation des Vorläufers im Cytoplasma zu tun.

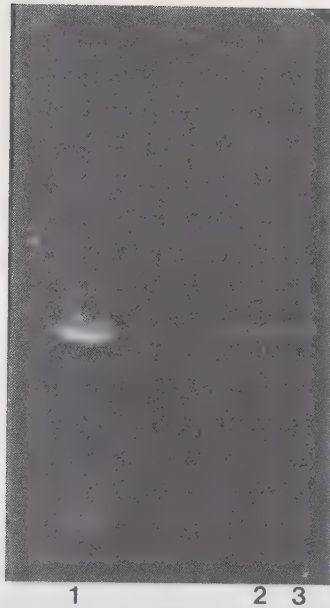


Abb. 14 Western-Blot. Der cytoplasmatische Überstand wurde nach Zentrifugation im Urographin Stufengradienten im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit Bakterioopsin-Antikörpern inkubiert. Die Anfärbung erfolgte mit FITC markiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG. 1, Bakterioopsin aus der PM; 2, Zellysat; 3, Zellysat nach Inkubation mit 5 μ M CCCP.

Die Erfahrung hatte gezeigt, daß Bakterioopsin als stark hydrophobes Protein im denaturierten Zustand ausfällt und nur in Ameisensäure zu lösen ist. Da es sich außerdem um das reife Protein handelt, blieb der Verdacht, daß trotz der Ergebnisse der Kontrollversuche noch Spuren der Membranfetzen in der Fraktion verblieben waren. Um einen empfindlicheren Nachweis zu haben, wurde radioaktiv markierte PM im Urographingradienten zentrifugiert (0.79 nMol, 69 μ C/mMol). Nach der Zentrifugation konnten im Bereich der löslichen Proteine noch 2% (0.016 nMol) der eingesetzten Probe detektiert werden. Durch die Zentrifugation konnte demnach keine vollständige Trennung erreicht werden, und die immunologische Kontrolle ist unter diesen Bedingungen zu unempfindlich.

1.3 In vivo Markierung mit Arginin als Energiequelle

Bei dem Versuch, den Vorläufer des Bakterioopsins im Cytoplasma durch Zerstören des Membranpotentials zu akkumulieren, wurde auch versucht, mit Arginin eine Energiequelle anzubieten, die Substratphosphorylierung erlaubt, und nicht zum Aufbau eines Membranpotentials genutzt wird, wie es bei der oxydativen- und Photophosphorylierung der Fall ist. Beim Abbau des Arginins durch die Umkehrung des Harnstoffzyklus wird durch das Phosphatgruppenübertragungspotential des Carbamoylphosphats direkt ATP synthetisiert. Auf diese Weise sollte es möglich sein, das Membranpotential zu zerstören, ohne sofort die Proteinbiosynthese zu unterbinden und den Vorläufer des Bakterioopsin im Cytoplasma zu akkumulieren, sofern bei einem postrationalen Prozessierungsmechanismus lediglich das Membranpotential zur Integration des Proteins an die Membran notwendig ist.

1.3.1 Vergleich der Energiequellen Licht/O₂, Alanin/O₂ und Arginin/N₂

Zum Vergleich der Energiequellen Licht, Alanin/O₂ und Arginin/N₂ wurden die Zellen wie unter C 2.2 beschrieben vorbehandelt. Da zum Zählen die Zellen lediglich abzentrifugiert und lysiert wurden, konnte bei diesem Versuch nicht zwischen Aufnahme und Einbau von ³⁵S-Methionin unterschieden werden. Abb.15 zeigt die Aufnahme und den Einbau von ³⁵S-Methionin in Abhängigkeit von der Zeit mit den verschiedenen Energiequellen.

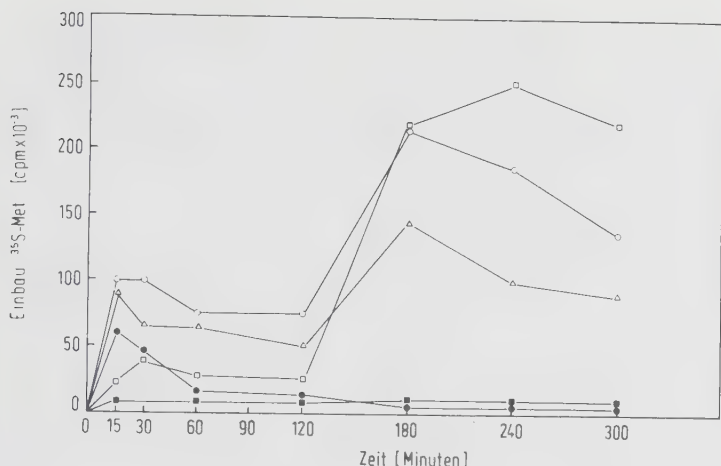


Abb. 15 In vivo Markierung des Stammes JW-5 unter Verwendung verschiedener Energiequellen. 5 ml (OD 2) der Zellsuspension wurden bei 37°C mit 1,7 μ C 35 S-Methionin (1295 C/mMol) inkubiert. 500 μ l der Zellsuspension wurden mit 3 ml kaltem BS (-15°C) versetzt, zentrifugiert und in 200 μ l H_2O /DNase lysiert. 10 μ l des Zellysats wurden zum Zählen mit 3 ml Szintillationslösung versetzt. 1.0000 Licht/ O_2 ; 2. $\Delta\Delta\Delta\Delta$ Arginin (0.5%)/ N_2 zum Zeitpunkt 0 auf N_2 umgestellt; 3. $\bullet\bullet\bullet\bullet$ Arginin (0.5%)/ N_2 30 min vor Inkubation auf N_2 umgestellt; 4. $\square\square\square\square$ Alanin 0.5%/ O_2 ; 5. $\blacksquare\blacksquare\blacksquare\blacksquare$ N_2 ohne Energiequelle.

Mit Licht (Kurve 1) und Arginin/ N_2 (Kurven 3 und 3) wird 35 S-Methionin sehr schnell aufgenommen, die Reaktion erreichte nach 15 min ein erstes Maximum. Wurden die Zellen 20 min vor der Zugabe von 35 S-Methionin unter N_2 -Atmosphäre inkubiert, (Kurve 3), sank die Aktivität auf 60%. Mit Alanin/ O_2 beobachtete man diese rasche Aufnahme von 35 S-Methionin nicht (Kurve 4). Dies könnte man mit einem gemeinsamen Transportprotein erklären. Da Alanin im Überschuß vorliegt, kann Methionin nur langsam aufgenommen werden. Die Kontrolle mit N_2 ohne Arginin (Kurve 5) zeigte, daß eine Energiequelle zur Aufnahme notwendig war.

Nach 120 min beobachtet man eine Steigerung der Reaktion, die zwischen 180 und 240 min ein zweites Maximum erreicht. Hier sieht man einen deutlichen Unterschied zwischen den Zellen, die 20 min vor Zugabe von ^{35}S -Methionin unter N_2 -Atmosphäre inkubiert wurden (Kurve 5) und denen, die erst mit Zugabe von ^{35}S -Methionin auf N_2 umgestellt wurden (Kurve 2). Unter anaeroben Bedingungen findet nach der ersten Aufnahme von ^{35}S -Methionin keine Aufnahme mehr statt, nach 60 min sind die Werte mit denen des Kontrollwertes vergleichbar. Der Sauerstoffrest aus der Probe (2) läßt die Reaktion mehr wie in den Proben mit Licht und Alanin/ O_2 verlaufen. Nach 3-stündiger Inkubation wurden die synthetisierten Proteine durch SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die Autoradiographie (Abb.16) zeigt den unterschiedlichen Verlauf der Reaktionen.

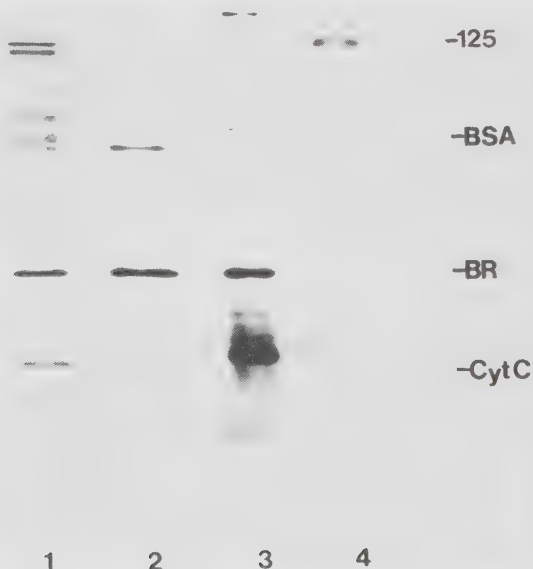


Abb.16 Autoradiogramm der in vivo markierten Produkte. 5 μl des Zellysats wurden im SDS-Gel aufgetrennt. 1, Licht/ O_2 ; 2 Alanin 0.5%/ O_2 ; 3 Arginin 0.5%, N_2 zum Zeitpunkt 0; 4 Arginin 0.5%, N_2 30 min vor Inkubation.

In den Proben (1), (2) und (3) ist Bakterioopsin das Hauptprotein, in Probe (4) findet man nur ein Protein von 125 K. Dies konnte auf zwei Arten gedeutet werden.

-Durch die anaeroben Bedingungen wird die Genexpression so gesteuert, daß nur dies eine Protein synthetisiert wird.

-Bei dem 125 K Protein handelt es sich um einen Vorläufer des Bakterioopsins, dessen Prozessierung unter den Energie-mangelbedingungen verhindert ist.

1.3.2 Versuch der Überführung des 125 K Proteins in Bakterioopsin

Um zu überprüfen ob es sich bei dem 125 K Protein um einen Vorläufer des Bakterioopsins handelt, wurde versucht, dieses Protein in einem 'PulseChase-Experiment' unter aeroben Bedingungen in das reife Bakterioopsin zu überführen. Die Markierung wurde wie unter C 2.2 beschrieben durchgeführt. Nach 20 min wurde die Reaktion mit kaltem Methionin gestoppt, und die Probe unter den normalen Alanin/O₂ Bedingungen 1 h nachinkubiert. Nach 15, 30 und 60 min wurden Proben genommen, um den Verlauf der Reaktion zu verfolgen. Die Autoradiographie zeigt, daß unter diesen Bedingungen kein Bakterioopsin gebildet wird. Damit ist es ausgeschlossen, daß es sich bei dem 125 K Protein, um den Vorläufer des Bakterioopsins handelt. Dieses Ergebnis wurde später durch die Identifizierung der mRNS des Bakterioopsins bestätigt.

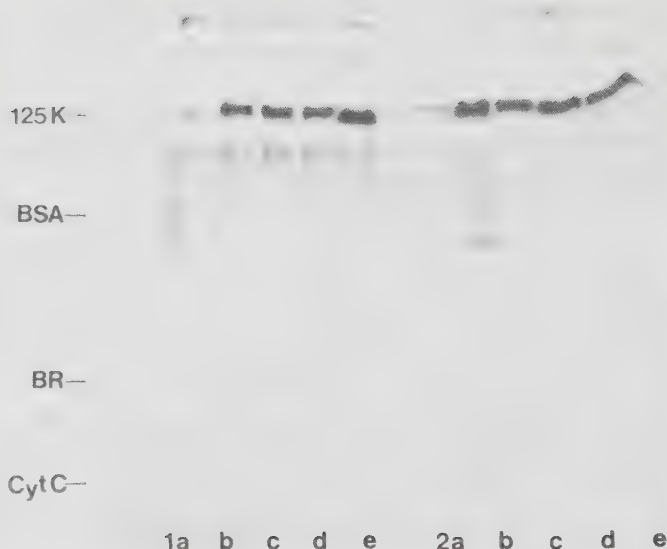


Abb.17 'Pulse-chase' Experiment. Die zugegebenen Aminosäuren waren 0.5%ig. 5 ml Zellsuspension (OD_{440} 2) wurden 30 min unter N_2 vorinkubiert, anschließend mit Arginin und 1.7 μC ^{35}S -Methionin (1295 C/mMol) versetzt und nach weiteren 20 min mit 50 mM Methionin. 500 μl der Zellsuspension wurden zentrifugiert und in 200 μl H_2O /DNase lysiert. 5 μl des Zellysates wurden im SDS-Gel aufgetrennt und autoradiographiert. **1a,b** Markierung nach 10 und 20 min mit Arginin 0.5%/N₂; **c,d,e**, 15, 30 und 60 min nach Stoppen der Reaktion mit 50 mM Methionin; **2a,b** wie 1a,b; **c,d,e** 15, 30 und 60 min nach Stoppen der Reaktion mit 50 mM Methionin und Zugabe von Alanin /O₂.

2. In vitro Versuche zur Biosynthese des Bakterioopsins

Da unter in vivo Bedingungen der Vorläufer des Bakterioopsins nicht nachgewiesen werden konnte, und damit keine Aussagen über den Prozessierungsmechanismus möglich waren, und das klonierte Bakterioopsin-gen in E.coli nur ungenügend exprimiert wird (M.Betlach pers. Mitteilung), wurde versucht durch in-vitro-Translation im homologen System, den Vorläufer des Bakterioopsins zu markieren um seine Prozessierung zu studieren.

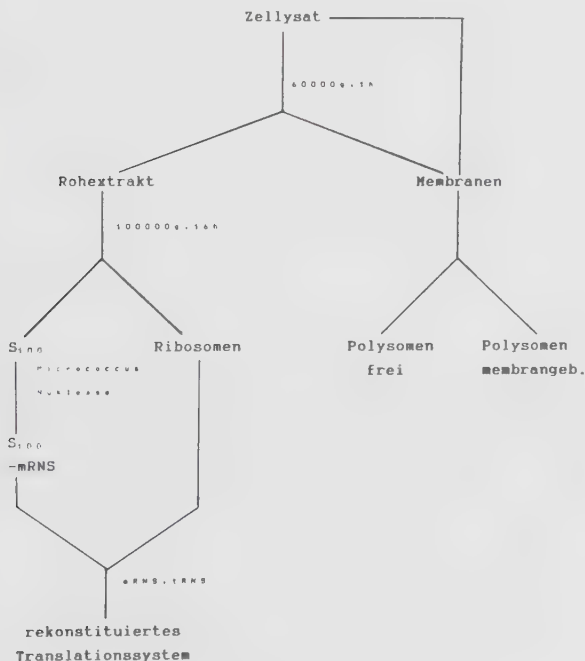


Abb.18 Schematische Darstellung der Präparation der zur in-vitro-Translation eingesetzten Zellfraktionen

2.1 In-vitro-Translation mit einem Zellrohextrakt aus *Halobacterium halobium*

Als erstes wurde ein Zellrohextrakt aus den Mutanten ET 1001 und JW-5 hergestellt. Die Zellen wurden in der frühen stationären Phase (OD_{440} 0.4-0.5) geerntet, die bei den Bakteriorhodopsin produzierenden Zellen in vivo der Zeit der Maximalsynthese des Bakteriorhodopsins entspricht.

Die Präparation des Rohextrakts und der Translationsansatz beruhen auf den Arbeiten von Bayley & Griffiths (1968). Im Unterschied zu dieser Methode wurden die Zellen jedoch nicht durch Homogenisation, sondern durch Dialyse gegen eine Lösung von 3.4 M KCl, 0.1 M MgAcetat, 0.01 M HEPES pH 7.6 geöffnet. Die DNS wurde nicht mit DNase verdaut, sondern durch hochtoutige Zentrifugation des Rohextrakts zusammen mit den Membranen abgerennt (C 2.7.1). Der gewonnene Zellextrakt wurde wie unter C 2.7.5 beschrieben zur Translation eingesetzt. Abb.19 zeigt den Einbau von ^{35}S -Methionin in Abhängigkeit von der Zeit bei 37°C in präzipitierbares Material. Die Quantifizierung wurde wie unter C 2.7.11 beschrieben durchgeführt. Das Maximum des Einbaus wird nach 45' erreicht. Die in-vitro Translationen wurden daraufhin unter diesen Standardbedingungen durchgeführt.

Um die spezifische Aktivität des Rohextrakts zu bestimmen, wurde der Einbau von ^{35}S -Methionin in Abhängigkeit von der optischen Dichte (260 nm) des Rohextrakts gemessen (Abb.20). Zur Bestimmung der Ribosomenkonzentration im Rohextrakt wurden die nach der quantitativen Abtrennung der Ribosomen ermittelten Werte übernommen (C 2.5.3). Nach diesen Ergebnissen werden 59% der optischen Dichte bei 260 nm durch Ribosomen verursacht. Mit diesen Werten wurde eine durchschnittliche Aktivität von 1.5×10^{-3} Moleküle/45 min ^{35}S -Methionin/Ribosom (625 pMol ^{35}S -Methionin/ 100 μg rRNS) gemessen. Im poly(U) abhängigen Translationssystem konnten

Werte bis zu 20-35 ϵ^{14} Phe/Ribosom erzielt werden (pers. Mitteilung K.Nierhaus). In diesem System konnte jedoch keine Translation von mRNS nachgewiesen werden. mRNS-abhängige Translationssysteme erreichen Aktivitäten von 4.05 pMol/ 100 μ g rRNS (E.coli; Nathans et al 1962) und 105 pMol 35 Leu/100 μ g rRNS (Hefe; Gasior et al 1979). Im Translationssystem von E.coli beziehen sich diese Werte auf die Translationsaktivität nach Vorinkubation und Zugabe exogener mRNS.

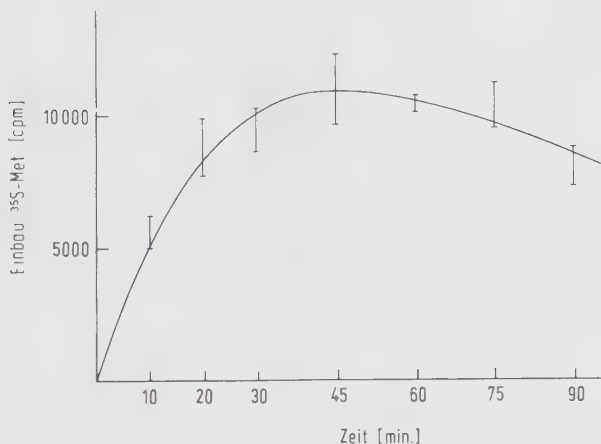


Abb.19 In vitro Translation im Zellrohextrakt. Zur Translation wurden 40 μ l Rohextrakt (OD_{260} 29) und 2 μ C 35 S-Methionin (1440 C/mMol) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Zum Zählen wurden 10 μ l des Inkubationsansatzes in 200 μ l 50 mM NaOH 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 1 ml 25% TCA versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit 5% TCA gewaschen und mit 6 ml Szintillationslösung versetzt.

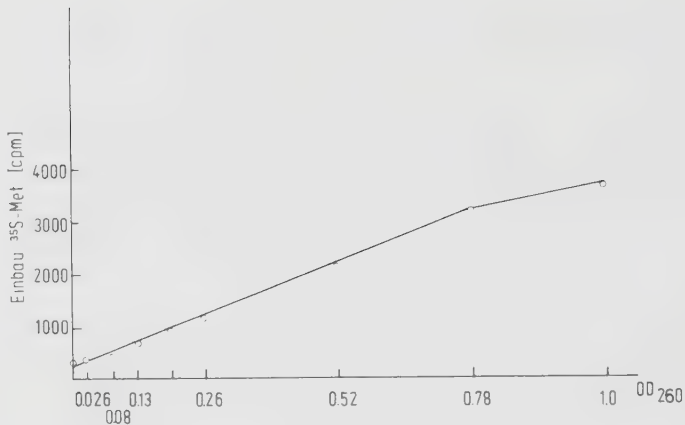


Abb.20 Abhängigkeit der Translationsaktivität von der Rohextraktkonzentration bei 37°C, 0.05 μ C 35 S-Methionin (1440 C/mMol) 10 μ l des Inkubationsansatzes wurden 10 min in 200 μ l 50 mM NaOH und anschließend mit 1 ml 25% TCA versetzt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und mit 6 ml Szintillationslösung versetzt.

Die Translationsprodukte wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Fluorographie zeigte ein scharfes Muster von Proteinen. Die Hauptprodukte lagen bei 56,62,80 und 96 KD. Auffallend war, daß im Bereich des Bakterioopsins keine Proteinbande zu finden war (Abb.21).

Da das Translationssystem zu einem Zeitpunkt hergestellt wurde, zu dem in vivo fast ausschließlich Bakteriorhodopsin synthetisiert wird, ließ dieses Ergebnis folgende Interpretationen zu:

- Bakterioopsin entsteht als hochmolekulares Protein, dessen Prozessierung blockiert ist,
- bei den hochmolekularen Produkten handelt es sich um Aggregate des Bakterioopsin oder seines Vorläufers,
- während der Präparation des Rohextraktes wird die mRNS des

Bakterioopsins zusammen mit membranengebundenen Polysomen abzentrifugiert.

- oder aber die mRNS des Bakterioopsin wird unter diesen Bedingungen nicht translatiert.

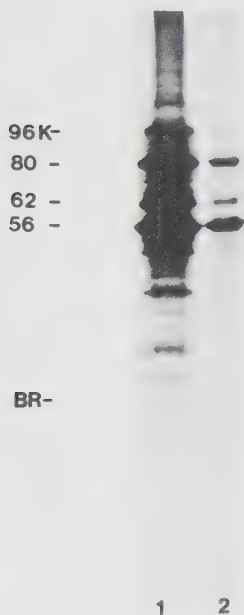


Abb.21 Fluorographie der im SDS-Gel aufgetrennten Translationsprodukte des Rohextrakts. 1, überexponierte Probe; 2, normal exponierte Probe

2.2 Anreicherung und Identifizierung der Bakterioopsin-mRNS

Zur Isolierung der RNS wurde der Stamm ET 1001 verwendet. Zucht und Ernte erfolgten unter den selben Bedingungen wie zur Präparation des Rohextrakts und zur in-vivo-Markierung (C 2.2 und 2.7.1). Die Zellen wurden nach der Methode von Chirgwin et al. (1979) mit Guanidinthiocyanat aufgeschlossen und die RNS durch Zentrifugation durch ein Cäsiumchloridkissen von der DNS, den Membranen und den Proteinen getrennt (C 2.6). Die mRNS wurden im linearen 7-30%igen (w/w) Rohrzuckergradienten aufgetrennt (Abb.22).

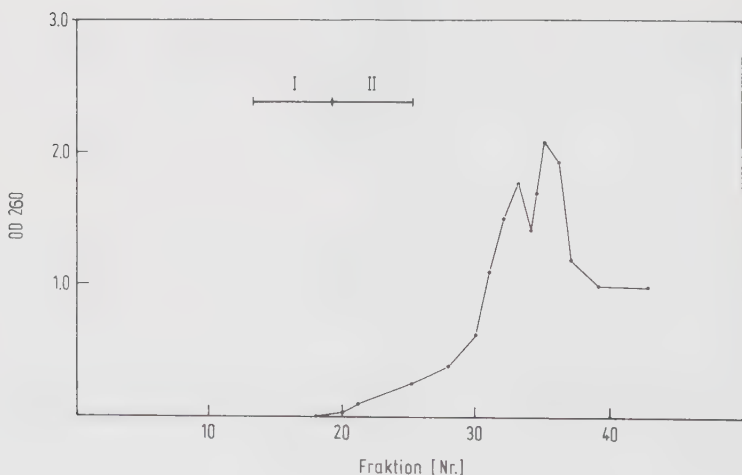


Abb.22 Rohrzuckergradient (7-30% in 20 mM HEPES pH 7.6, 0.1 M LiCl, 0.5% NaSDS) der Gesamt-RNS aus *Halobacterium halobium*.

Zur Größenbestimmung wurden die einzelnen Fraktionen durch Glyoxilieren denaturiert (C 2.9.3) und im Agarose-Gel aufgetrennt (Abb.23a). Die Filterhybridisierung mit dem klonierten Bakterioopsin-gen (Abb.23b) zeigte eine radioaktive Bande, die im Agarose-Gel einem prominenten Produkt mit der Größe von 0.7 Kb entsprach. Dieser Wert stimmt mit dem von der Größe des Proteins zu erwartenden Wert von 0.78 kb überein. Damit war ausgeschlossen, daß es sich bei den hochmolekularen in-vitro-Translationsprodukten um einen Vorläufer des Bakterioopsins handelte.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß die mRNA des Bakterioopsins zum Zeitpunkt der Ernte einer prominenten Bande entspricht, und damit die in vivo beobachtete hohe Syntheserate des Bakteriorhodopsins widerspiegelte. Als weiteres prominentes Transkriptionsprodukt ist eine 7S RNS charakterisiert worden. Nach den Ergebnissen des Labors von W.Goebel weist diese RNS sowohl in der Sequenz als auch in der Sekundärstruktur große Homologien zur eukaryontischen 7S RNS auf, die als Teil des SRP's identifiziert wurde.

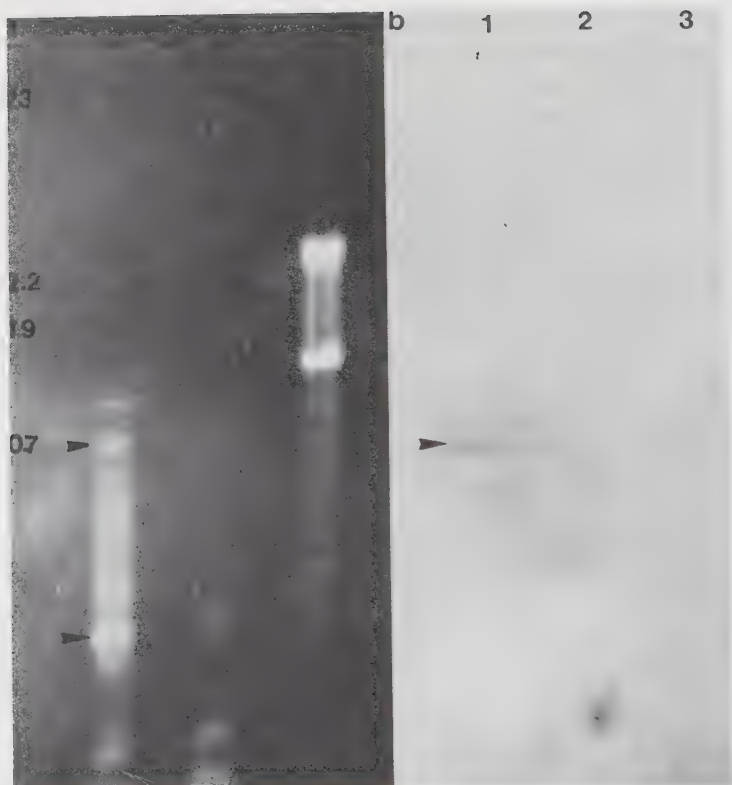


Abb.23a Auftrennung der glyoxilierten RNS im Agarose-Gel (1.5%). Das Gel wurde mit Acridin Orange angefärbt. 1, Fraktion II des Sucrosegradienten; 2, Fraktion I des Sucrosegradienten; 3 Gesamt-RNS; **b** 'Nothern Hybridisierung' mit dem klonierten Bakterioopsin-gen.

2.3 Vergleich der Translations- und Transkriptionsprodukte der Stämme JW-5 und L33

Der Phänotyp der Stämme JW-5 und L33 ist folgendermaßen charakterisiert:

L33	BO ⁻	HO ⁺	Ret ⁺	Rub ⁻
-----	-----------------	-----------------	------------------	------------------

JW-5	BO ⁺	HO ⁺	Ret ⁻	Rub ⁻
------	-----------------	-----------------	------------------	------------------

Die Ursache für den Opsindefekt im Stamm L 33 ist eine Insertion von 0.5 kb im Opsingen (DasSarma et al. 1983). Durch den Vergleich der Stämme sollten folgende Fragen beantwortet werden:

Unterscheiden sich die Proteinmuster der in-vitro-Translationprodukte und kann durch das Fehlen eines Proteins der Vorläufer identifiziert werden, und wie beeinflußt die Insertion im Stamm L33 die Expression des Bakterioopsin-gens?

2.3.1 Vergleich der Translationsprodukte

Die Präparation des Zellextrakts aus dem Stamm L 33 erfolgte wie unter C 2.7.1 beschrieben nach Erreichen der spätlogarithmischen Phase bei einer OD₆₀₀ von 0.7-0.8. Das SDS-Gel der Translationsprodukte zeigte, daß die Proteinmuster identisch waren. Auch im hochmolekularen Bereich trat keine Bande auf, die nur der Bakterioopsin produzierenden Mutante zugeschrieben werden konnte. (Abb.24)

80K-
62 -
56 -
38 -

BR-

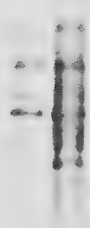


Abb.24 Vergleich der Translationsprodukte des Rohextrakts der Stämme ET 1001 und L-33. 1, Bakterioopsin aus der PM; 2, ET 1001; 3, L-33.

2.3.2 Vergleich der Transkriptionsprodukte

Um die Frage nach der Wirkung der Insertion im Gen zu beantworten, wurden die Transkriptionsprodukte aus JW-5 und L 33 verglichen. Die mRNS wurde wie unter C 2.8 beschrieben angereichert. Die Fraktion wurden im 2% Agarose/HarnstoffGel aufgetrennt (Abb.25a). Die Filterhybridisierung zeigte für JW-5 eine starke Anfärbung, in der L 33 RNA-Präparation wurden zwei kleinere Produkte geringerer Konzentration markiert (Abb.25b). Die kleineren Produkte entstehen möglicherweise durch Kettenabbruch durch ein Stoppsignal, das durch die Insertion in das Gen übertragen wurde.

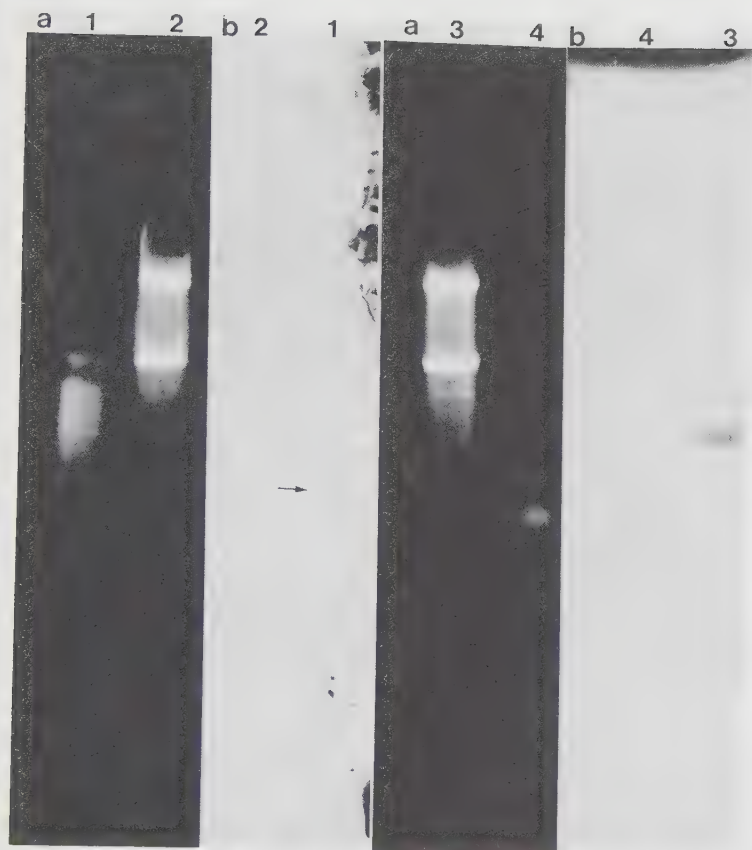


Abb.25a Ethidiumbromid gefärbts Agarose/Harnstoff-Gel (1.5%). 1, Fraktion II der RNS-Präparation aus L-33; 2, Gesamt-RNS aus L-33; 3, Gesamt-RNS aus ET 1001; 4, Fraktion II der RNS-Präparation aus ET 1001;
b Northern Hybridisierung mit dem klonierten Bakterioopsin-Gen.

2.4 Isolierung von freien und membrangebundenen Polysomen

Da die mRNA des Bakterioopsins zum Zeitpunkt der Ernte Agarose-Gel als prominente Bande identifiziert werden konnte, andere Proteine jedoch die Hauptprodukte der in-vitro-Translation waren, blieb die Vermutung, daß die mRNA des Bakterioopsins während der Präparation des Rohextrakts zusammen mit membrangebundenen Polysomen abzentrifugiert wurde. Um dies herauszufinden, wurden aus dem Zellysatz durch Zentrifugation im Rohrzuckergradienten freie und membrangebundene Polysomen isoliert und zur in-vitro-Translation eingesetzt. Die für *E. coli* entwickelte Methode der Isolierung (Randall 1982) wurde den halobakteriellen Ionenstärken angepaßt (C 2.7.2). Zucht und Ernte der Zellen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie zur Präparation des Rohextrakts (C 2.7.1). Die Zellen wurden jedoch mit Na-Desoxycholat geöffnet. Freie und membrangebundene Polysomen wurden durch Zentrifugation im Rohrzuckergradienten angereichert (Abb.26). Der zur Rekonstitution des Translationssystems benötigte ribosomenfreie Zelleextrakt (S_{150}) wurde durch Zentrifugation der lysierten Zellen hergestellt. Freie und membrangebundene Polysomen und der ribosomenfreie S_{150} Überstand wurden wie unter C 2.7.7 beschrieben zur Translation eingesetzt.

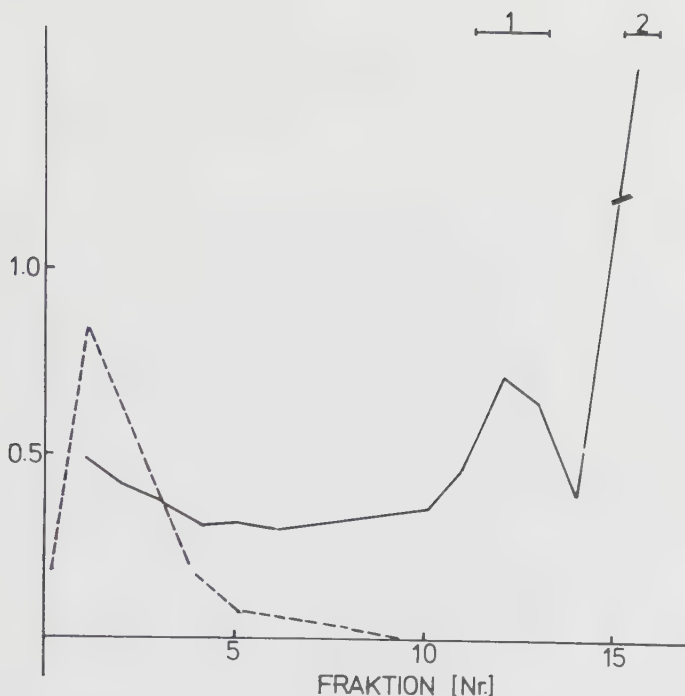


Abb.26 Präparation von freien und membrangebundenen Polysomen durch Dichtezentrifugation des Zellysats im Sucrosegradienten (7-30% auf einem 50% Polster in 3.4M KCl. 0.1 MgAcetat, 0.01 HEPES pH 7.5). — Zellysat (1 ml: 1.5-2 g Zellnaßgewicht) aus JW-5; --- Rohextrakt aus JW-5.

Die Fluorographie (Abb.27) der im SDS-Gel aufgetrennten Translationsprodukte zeigte wieder kein Protein in der Größe der Bakterioopsins oder seines Vorläufers. Damit war bewiesen, daß die Präparationsmethode nicht die Ursache für das fehlende Bakterioopsin war. Die Translationsprodukte der freien und membrangebundenen Polysomen unterschieden sich nicht. Die Membranen allein waren demnach nicht ausreichend, den Messenger des Bakterioopsins zu translatieren. Da unter diesen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die Ribosomen unspezifisch an die Membran gebunden waren, sind weitere Aussagen nicht möglich. Das Proteinmuster

unterschied sich jedoch von dem des Rohextrakts. Das Hauptprodukt ist ein 80 kD großes Protein.

80-

26

1

2

3

4

Abb.27 Fluorographie der im SDS-Gel aufgetrennten Translationsprodukte der freien und membrangebundenen Polysomen. 1, Bakterioopsin aus PM; 2, S_{150} Überstand; 3, freie Polysomen (Fraktion 1 des Sucrosegradienten); 4 membrangebundene Polysomen (Fraktion 2 des Sucrosegradienten).

2.5 Versuche zur spezifischen Translation in *Halobacterium halobium*

Die Versuche zur in-vitro- Translation deuteten darauf hin, daß unter diesen Bedingungen die mRNA des Bakterioopsins nicht translatiert wurde. Um dies zu beweisen, wurde versucht im halobakteriellen in-vitro-Translationssystem exogen zugegebene mRNA des Bakterioopsins zu translatieren. Als positive Kontrolle der spezifischen Translation sollten Translationsprodukte der mRNA des Stammes R₁ vor und nach Infektion mit dem halobakteriellen Phagen ϕ H₁ gelten. Voraussetzung hierfür war, daß die Translation unter diesen Bedingungen neu initiiert wurde. Da das System durch die endogene mRNA bereits gesättigt war, mußte zur spezifischen Translation die endogene mRNA abgebaut werden.

2.5.1 Abbau des endogenen Messengers durch Vorinkubation.

Der Rohextrakt wurde wie auf unter C 2.7.1 beschrieben mit allen Komponenten außer ³⁵S-Methionin für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut ATP, GTP und PEP, diesmal jedoch in 3.4 M KCl, 0.07 M MgAc, 0.01 M HEPES pH 7.6 zugegeben. Die Endkonzentration an Mg²⁺ betrug 45 mM. Nach Zugabe von mRNA (Fraktion der RNS-Präparation aus ET 1001, 0.4, 0.8 und 1.2 µg) wurde die Reaktion mit 20 µC ³⁵S-Methionin (1440 C/mMol) gestartet. Die Proben wurden wie unter C 2.7.11 beschrieben behandelt und gezählt. (Abb.28) Die Fluorographie (Abb.29) der im SDS-Gel aufgetrennten Translationsprodukte spiegelte den gezählten Einbau wider, da der Hintergrund jedoch immer noch sehr hoch, und das Ergebnis auch nicht eindeutig reproduzierbar war, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

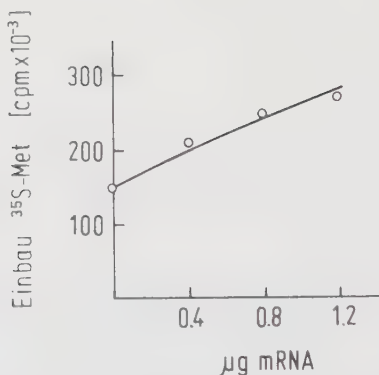


Abb. 28 Einbau von ^{35}S -Methionin in Abhängigkeit von der zugegebenen mRNS (Fraktion 2 der RNS-Präparation aus ET 1001) Konzentration nach Vorinkubation (3h 37°C) des Rohextraktes (L-33). Der Inkubationsansatz (20 μC ^{35}S -Methionin) wurde in der Kälte mit 1 ml 25% TCA versetzt, 2x mit 5% TCA, 1x mit EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 μl 10% SDS gelöst. 5 μl wurden mit 3 ml Szintillationslösung versetzt und gezählt.



Abb. 29 Fluorographie der im SDS-Gel aufgetrennten Translationsprodukte nach Vorinkubation (3h, 37°C) des L-33 Rohextrakts. 1, BR aus PM; 2 Rohextrakt; 3, Rohextrakt mit 0.4, 0.8 und 1,2 μg mRNS aus ET 1001; Rohextrakt mit 4 μg Gesamt-RNS.

2.5.2 Abbau des endogenen Messengers durch Micrococcus-Nuclease

Die Inkubation von Translationssystemen mit Micrococcus Nuclease ist ein bekanntes Verfahren zum Abbau endogener mRNS. Da die Micrococcus Nuclease Ca^{2+} -abhängig ist, kann die Reaktion durch den für Ca^{2+} spezifischen Komplexbildner EGTA gestoppt werden. Auf diese Weise bleibt nach der Inkubation zugegebene mRNS intakt und translatierbar. Da die Micrococcus Nuclease unter den Hochsalzbedingungen wesentlich weniger aktiv ist, mußten die Inkubationsbedingungen optimiert werden (C 2.7.5). Da eine Einheit der Micrococcus Nuklease bei 37°C in 1h 1 ODml DNS (10 mM Tris/HCl pH 7.6) abbaut, diente Kalbsthymus DNS als Kontrolle der Reaktion. Um die Aktivität der Nuklease bei den hohen Ionenstärken des Rohextrakts zu testen, wurde KalbsthymusDNS (1 ODml) in 3.4 M KCl, 0.1 M MgAc, 0.01 M HEPES pH 7.6, inkubiert mit 150 Einheiten Micrococcus Nuclease, eingesetzt. Die Proben wurden bei 37°C inkubiert. Nicht verdautes Material wurde präzipitiert und diente damit indirekt als Nachweis der Nukleasenaktivität (C.2.7.5). Abb.30 zeigt die Kinetik der Nuclease Reaktion. Im Hochsalz wurde die DNS mit 150 Nukleaseeinheiten bis zu 30% abgebaut, in 10 mM Tris hingegen reichte bereits 1 Einheit, um die DNS zu verdauen. Der inkubierte Rohextrakt zeigte ebenfalls bei 260 und 280 nm eine Abnahme, aber erst der Quotient aus 260/280 nm zeigte, daß sich durch die Nuklease Behandlung das Verhältnis zu Gunsten der 280 nm Absorption verschob (Abb.31). Dieser Versuch zeigte, daß auch bei den hohen Ionenstärken Nuclease-aktivität nachgewiesen werden konnte.

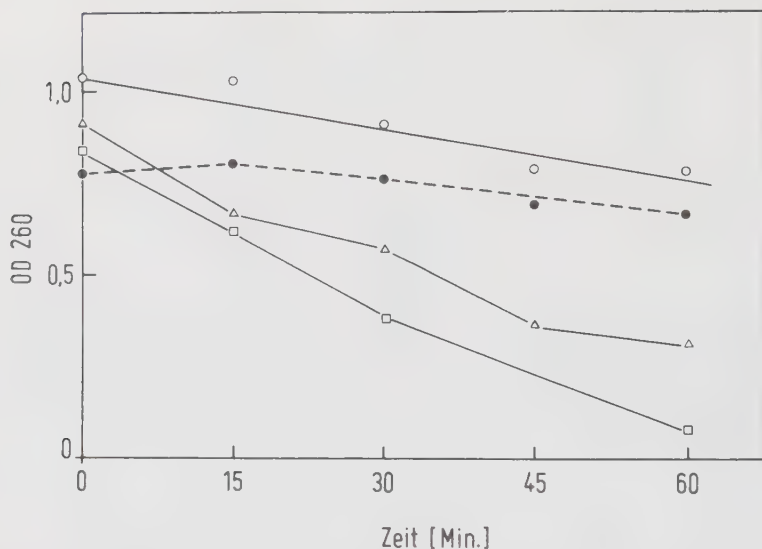


Abb.30 Kinetik der *Micrococcus Nuclease* Behandlung. 1 OD_{ml₂₆₀} wurden bei 37°C inkubiert, anschließend mit EtOH gefällt und vermessen. □ □ □ Kalbsthymus DNS in 10 mM Tris pH 7,6, 1 Einheit *Micrococcus Nuclease*; △ △ △ Kalbsthymus DNS in 3,4 M KCl, 0,1 MgAc, 0,01 HEPES pH 7,6, 150 Einheiten *Micrococcus Nuclease*; ○ ○ ○ Rohextrakt 150 Einheiten *Micrococcus Nuclease*; ● ● ● OD₂₆₀ des inkubierten Rohextrakts.

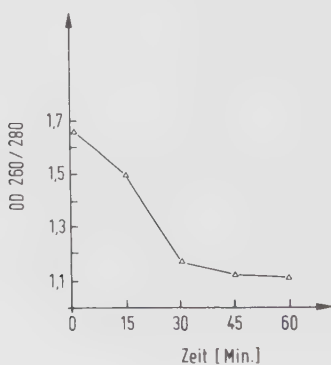


Abb.31 Kinetik der *Micrococcus Nuclease* Behandlung des Rohextrakts (1 OD_{ml₂₆₀}) dargestellt als Verhältnis OD_{260/280}. Die Proben wurden bei 37°C inkubiert, anschließend mit EtOH gefällt und vermessen.

2.5.3 Reaktivierung der Translation durch Zugabe von exogener mRNS.

Der mit *Micrococcus* Nuclease vorinkubierte Rohextrakt wurde wie unter C 2.7.6 beschrieben eingesetzt. Die zugegebene Menge an H_2O reduzierte sich durch die zugegebene Menge RNS-Lösung, so daß das Endvolumen von 21 μl nicht überschritten wurde. Abb.32 zeigt die Abhängigkeit des Einbaus von ^{35}S -Methionin von zugegebener Menge mRNS. Zum Zählen wurden die Proben wie unter C 2.7.11 beschrieben behandelt. Das Maximum der Reaktivierung wird mit 0.07 μg mRNS erreicht, der Einbau von ^{35}S -Methionin konnte um den Faktor von 3.6 gesteigert werden.

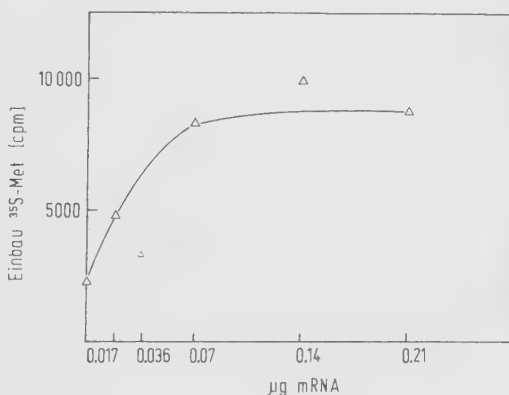


Abb.32 Einbau von ^{35}S -Methionin in Abhängigkeit von der mRNS Konzentration nach *Micrococcus* Nuclease Behandlung des Rohextrakts (JW-5). 10 μl des Inkubationsansatzes (0.05 μC ^{35}S -Methionin 1440 C/mMol) wurden 10 min in 50 mM NaOH bei 37°C inkubiert, mit 25% TCA in der Kälte versetzt, filtriert und mit 6 ml Szintillationslösung versetzt.

Die Kinetik der Reaktion zeigt (Abb.33), daß das reaktivierte System die Aktivität des Rohextrakts erreicht, nach 60 min sinkt der Einbau von ^{35}S -Methionin auf 71%.

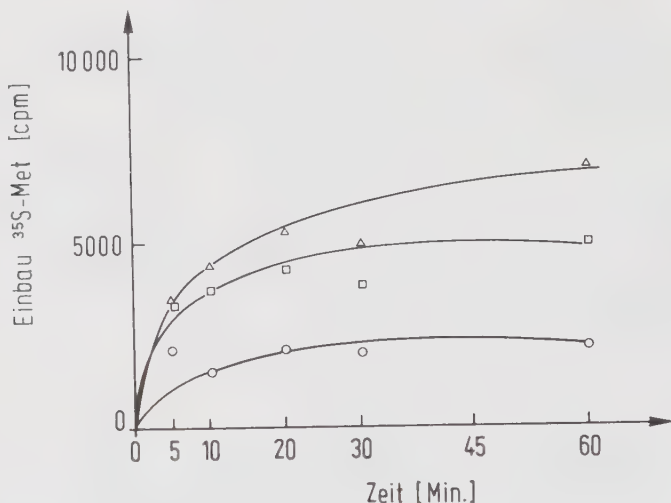


Abb.33 Kinetik des Einbaus von ^{35}S -Methionin des unbehandelten und Micrococcus Nuklease behandelten Rohextrakts aus JW-5. 10 μl des Inkubationsansatzes (0.05 μC ; 1440 C/mMol) wurden 10 min bei 37°C in 200 μl 50 mM NaOH inkubiert, mit 25% TCA versetzt, filtriert und mit 6 ml Szintillationslösung versetzt. $\Delta\Delta\Delta$ Rohextrakt, unbehandelt; $\square\square\square$ Rohextrakt, Micrococcus Nuclease behandelt + 0.07 μg mRNA (Fraktion II des RNS-Präparation aus ET 1001); $\circ\circ\circ$ Rohextrakt, Micrococcus Nuclease behandelt.

Die Ergebnisse waren nicht eindeutig reproduzierbar. Manchmal war die mRNA überhaupt nicht abgebaut, es zeigte sich keine Verminderung der Aktivität nach Nuclease Behandlung, oder die Ribosomen waren ebenfalls angegriffen und das System nicht mehr reaktivierbar. Aus diesem Grunde wurde diese Methode nicht weiterverfolgt.

2.5.4 Isolierung der Ribosomen aus dem Rohextrakt

Um den Messenger vollständig verdauen zu können, ohne die Ribosomen ebenfalls zu zerstören, wurden diese durch Zentrifugation aus dem Rohextrakt isoliert. Der ribosomenfreie S_{100} Überstand sollte bis zur vollständigen Desaktivierung mit *Micrococcus Nuclease* behandelt und anschließend durch Zugabe von Ribosomen und mRNA reaktiviert werden. Zwei Voraussetzungen mußten hierfür erfüllt werden.

- (1) Der S_{100} Überstand mußte sich mit den Ribosomen wieder zu einem aktiven Translationssystem rekonstituieren lassen und
- (2) Hefe tRNA mußte als Ersatz akzeptiert werden, da unter diesen Bedingungen die halobakterielle tRNA ebenfalls verdaut worden war.

2.5.5 Rekonstitution des Translationssystems

Die Rekonstitution des Translationssystems wurde wie unter C 2.7.8 beschrieben durchgeführt. Die Testbedingungen entsprachen der unter C 2.7.11 beschriebenen Methode. Abb.34 zeigt den Einbau von ^{35}S -Methionin in Abhängigkeit von der Ribosomenkonzentration. Für S_{100} (OD_{240} 0.06) wird das Maximum mit 24 pMol Ribosomen erreicht. Daraus ergab sich eine durchschnittliche Aktivität von 3×10^{-4} Moleküle Methionin/Ribosom. Das rekonstituierte System verlor verglichen mit dem Rohextrakt 80% der Aktivität.

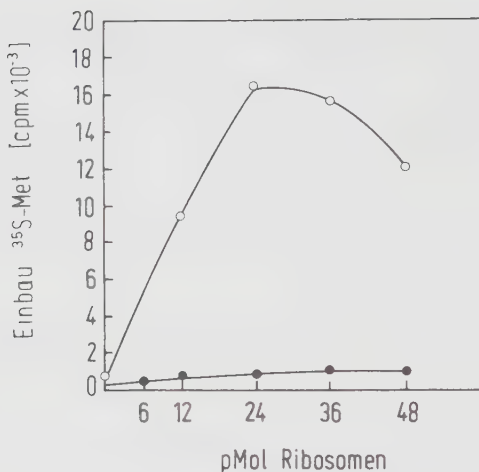


Abb.34 Rekonstitution des Translationssystems nach Trennung des Rohextrakts in S_{100} und Ribosomen. 10 μl des Inkubationsansatzes (0.05 μC ^{35}S -Methionin; 1440 C/mMol) wurden in 200 μl 50 mM NaOH 10 min bei 37°C inkubiert, mit 25% TCA versetzt, filtriert und mit 6 ml Szintillationslösung versetzt. $\circ\circ\circ$ S_{100} (5 μl OD₂₆₀ 12) + Ribosomen; $\bullet\bullet\bullet$ Ribosomen.

2.5.6 Inkubation des S_{100} Überstandes mit *Micrococcus* Nuclease

Im S_{100} Überstand wurde die noch verbliebene RNS vollständig verdaut. Die Bedingungen wurden so gewählt, daß selbst die tRNS zerstört wurde, und keine Beladung von tRNS mit ^{35}S -Methionin durch Präzipitation mit TCA in der Kälte mehr nachgewiesen werden konnte (C 2.7.11). Dies wurde durch 3 stündige Inkubation des S_{100} Überstandes mit 150 Einheiten *Micrococcus* Nuclease bei 37°C erreicht.

2.5.7 Reaktivierung der Beladung mit Hefe tRNS

Der mit *Micrococcus* Nuklease vorinkubierte S_{100} -Überstand wurde unter den Standardbedingungen (C 2.7.6) inkubiert. Das zugegebene Volumen von H_2O reduzierte sich durch das Volumen der tRNS-Lösung. Der Test wurde wie unter C 2.7.11 beschrieben durchgeführt. Abb.35 zeigt die Beladung von Hefe tRNS im S_{100} -Überstand. Das Maximum der Beladung wurde mit 70 μg tRNS erreicht. Nicht mit *Micrococcus* Nuklease behandelter S_{100} Überstand erreichte einen Wert von 8800 cpm. Daraus ergibt sich mit 70 μg tRNS (8000 cpm) ein Rückgewinnung der Aktivität von 90%.

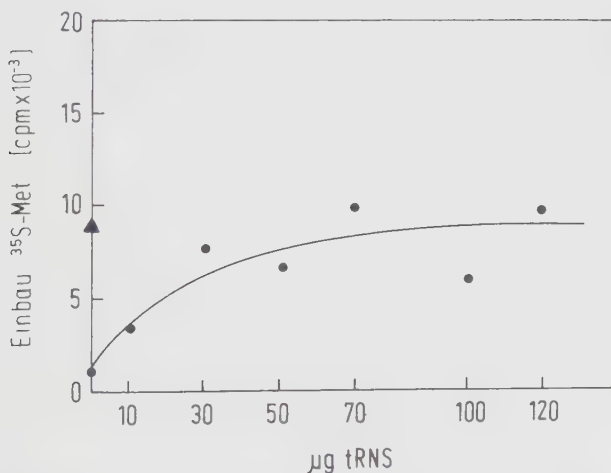


Abb. 35 Einbau von ^{35}S -Methionin nach *Micrococcus* Nuklease Behandlung des S_{100} Überstandes in Abhängigkeit von der tRNS (Hefe) Konzentration. 10 μl des Inkubationsansatzes (0.05 μC ^{35}S -Methionin; 1440 C/mMol) wurden 10 min bei $37^\circ C$ in 50 mM NaOH inkubiert, mit 25% TCA versetzt, filtriert und mit 6 ml Szintillationslösung versetzt. $\blacktriangle$ markiert den Wert, des unbehandelten Rohextrakts.

2.5.8 Translation von exogener mRNS

Damit schienen die Voraussetzungen für die Translation exogener mRNS erfüllt. Der Versuch wurde mit einer angereicherten mRNS-Fraktion und mit Gesamt-RNS wie unter C 2.7.10 beschrieben durchgeführt. Der Test entsprach den unter C 2.7.11 beschriebenen Bedingungen. Abb.36 zeigt den Einbau von ^{35}S -Methionin in Abhängigkeit von der mRNS Konzentration. Das Maximum wurde mit 0,75 μg RNS erreicht. Der Einbau von ^{35}S -Methionin konnte um den Faktor 1.8 gesteigert werden. Die Translation mit Gesamt-RNS erreichte mit 4 μg das Maximum der Reaktion (Abb.37) In diesem Fall wurde der Einbau von ^{35}S -Methionin um den Wert von 1.53 gesteigert.

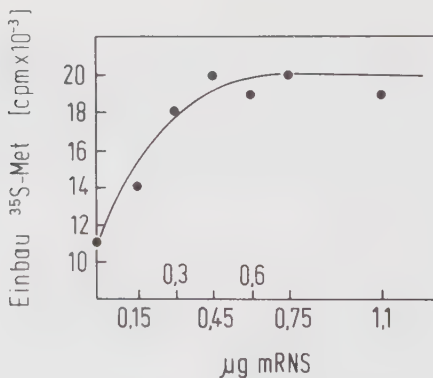


Abb.36 Einbau von ^{35}S -Methionin in Abhängigkeit von der mRNS Konzentration (Fraktion II der RNS Präparation aus ET 1001) nach Micrococcus Nuclease Behandlung des S_{100} Überstandes (OD_{260} 0.06 und Rekonstitution mit 20 pMol Ribosomen und 20 mg tRNS aus Hefe 10 μl des Inkubationsansatzes (0.05 μC ^{35}S -Methionin; 1440 C/mMol) wurden 10 min bei 37°C in 200 μl 50 mM NaOH inkubiert, mit 25% TCA versetzt, filtriert und mit 6 ml Szintillationslösung versetzt.

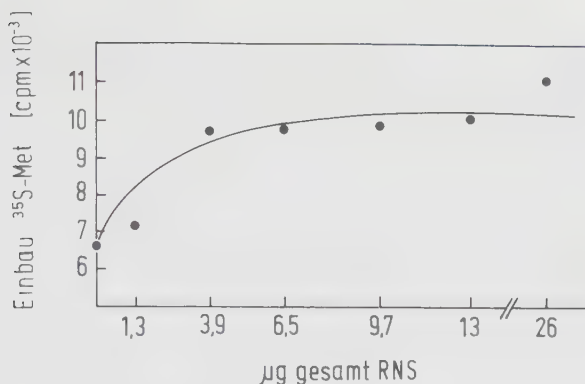


Abb. 37 Einbau von ^{35}S -Methionin in Abhängigkeit von der Gesamt-RNS Konzentration (ET 1001) nach Micrococcus Nuclease Behandlung des S_{100} Überstandes (OD_{260}) und Rekonstitution mit 20 pMol Ribosomen und 20 mg tRNS aus Hefe. 10 μl des Inkubationsansatzes (0.05 μC : 1440 C/mMol) wurden 10 min bei 37°C in 200 μl 50 mM NaOH inkubiert, mit 25% TCA versetzt, filtriert und mit 6 ml Szintillationslösung versetzt.

Die durchschnittlichen Werte des Einbaus von ^{35}S -Methionin sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die Translation wurde wie unter C 2.7.10 beschrieben mit 0.05 μC ^{35}S -Methionin (1440 C/mMol) durchgeführt. Die Quantifizierung entsprach den unter C 2.7.11 beschriebenen Bedingungen. C.2.7.11

	cpm
Rohextrakt:	3700
S_{100} Nuclease behandelt:	1400
S_{100} Nuclease behandelt/Ribosomen:	7800
S_{100} Nuclease behandelt/Ribosomen/mRNS:	19500
S_{100} Nuclease behandelt/Ribosomen/ges.RNS:	15500

Daraus ergab sich eine durchschnittliche Steigerung des Einbaus von ^{35}S -Methionin um den Faktor 2.5 mit mRNS und von 2 mit Gesamt-RNS. Im vergleichbaren zellfreien Translations-system aus Hefe konnte nach Zugabe exogener mRNA eine Steigerung des Einbaus um den Faktor 5 erzielt werden (Gasoir et al. 1979). In-vitro-Translation des RNA Phagen f2

brachte eine 40-fache Aktivierung des vorinkubierten *E.coli* lysats (Nathans et al. 1962). Im kauflichen Weizenkeim-Translationssystem findet man nach Zugabe reiner Globin-mRNS eine 17-fache Aktivität.

Damit war bewiesen, daß im homologen zellfreien System die Translation von neu initiiert wird.

Die Fluorographie der im SDS-Gel aufgetrennten Translationsprodukte (Abb.38) zeigte jedoch wieder keine Bande in Höhe des Bakteriorhodopsins oder seines Vorlaufers, obwohl zur Translation die Bakterioopsinmessenger reiche RNS-Fraktion verwendet wurde (Fraktion II aus Et1001). Die Translation führt jedoch zu vollständigen Produkten, wie durch die Intensität der Markierung der hochmolekularen Proteine gezeigt werden kann.

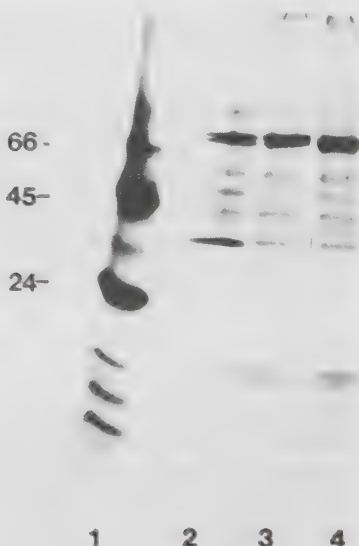


Abb.38 Fluorographie der im SDS-Gel aufgetrennten Translationsprodukte. 1, BSA (66 KD), Ovalbumin (45 KD), Trypsinogen (24 KD); 2, Rohextrakt; 3, S_{100} Überstand, *Micrococcus* Nuclease behandelt + 20 pMol Ribosomen + 20 mg tRNS (Hefe); 4, wie 3 + 0.75 μ g mRNS (Fraktion II der RNS Präparation aus ET 1001)

Da sich aber das Muster der Translationsprodukte mit und ohne mRNA nicht unterschied, wurde als Kontrolle mit Gesamt-RNS, isoliert aus dem Stamm R_1 vor und nach Infektion mit dem halobakteriellen Phagen ϕH_1 , translatiert. Die RNS wurde freundlicherweise von F.Gropp zur Verfügung gestellt. Die Fluorographie der im SDS-Gel aufgetrennten Translationsprodukte (Abb.39) zeigte zusätzliche Proteinbanden in der Größe von 110, 108 und 43 kD. Schwach erkennt man in der Spur, in der mit der RNS aus Phagen infizierten Zellen translatiert wurde, ein weiteres Protein von 80 kD. Dies entspricht in der Größe dem prominentesten Protein des Halophagen ϕH_1 . Damit war bewiesen, daß die Initiation der Translation zu neuen und vollständigen Produkten führte, und der Messenger des Bakterioopsins unter diesen Bedingungen nicht translatiert wurde.

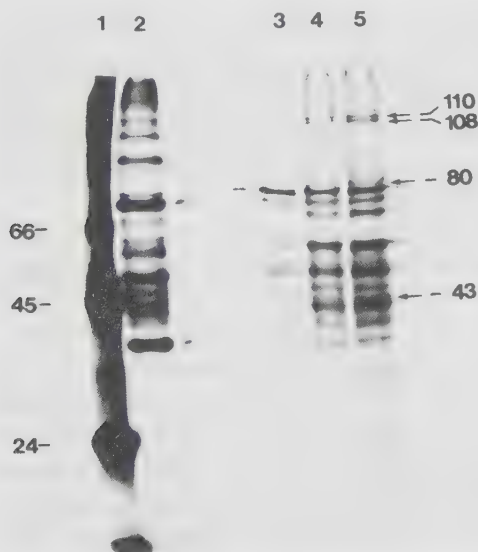


Abb.39 Fluorographie der im SDS-Gel (10-25%) aufgetrennten Translationsprodukte. 1, BSA (66 KD), Ovalbumin (45 KD), Trypsinogen (24 KD); 2 Rohextrakt (JW-5); 3, S_{100} Nuclease behandelt, rekonstituiert mit 20 pMol Ribosomen und 20 mg Hefe tRNS; 4, wie 2 mit Gesamt-RNS (4ug) aus R_1 ; 5 wie 2 mit Gesamt-RNS (4 ug) aus R_1 nach Phageninfektion mit ϕH_1 .

E Diskussion

Bakterioopsin konnte in vitro im Zellrohextrakt nicht translatiert werden. Obwohl die Zellen zu einem Zeitpunkt geöffnet wurden, zu dem in-vivo Bakterioopsin das Hauptprodukt der Proteinbiosynthese war, wurde kein Protein in der Größe des Bakterioopsins oder seines Vorläufers markiert. Stattdessen entstanden hochmolekulare Proteine, deren Hauptprodukte ein Molekulargewicht von 96,80,62 und 56 kD besaßen.

Durch Identifizierung des Bakterioopsin-messengers und Vergleich der Stämme ET 1001 (Bakterioopsinüberproduzent) und L33, einem Bakterioopsin defizienten Stamm, konnte ausgeschlossen werden, daß es sich bei den hochmolekularen Produkten um Bakterioopsin verwandte Proteine handelte. Die Filterhybridisierung mit dem klonierten Bakterioopsin-gen identifizierte eine prominente Bande des RNS-Gels als Bakterioopsin-messenger. Seine Größe von 0.7 kB entsprach dem nach der Aminosäuresequenz theoretisch zu erwartenden Wert. Die Konzentration der mRNA des Bakterioopsins zum Zeitpunkt der Ernte spiegelte die in vivo beobachtete hohe Syntheserate wider.

Die Translationsmuster der Stämme ET 1001 und L33, die sich phänotypisch nur durch die Abwesenheit des Bakteriorhodopsins unterscheiden, waren identisch, sofern die Zellen in der gleichen Wachstumsphase geerntet wurden. In den Translationsprodukten des Bakterioopsinüberproduzenten konnte kein Protein gefunden werden, das nicht auch im Zellrohextrakt des Stammes L33 markiert wurde. Der Vergleich der Transkriptionsprodukte der Stämme zeigte, daß im bakterioopsin-defizienten Stamm kein vollständiger Bakterioopsin-messenger synthetisiert wurde. Stattdessen wurden zwei kleinere Fragmente geringerer Konzentration

markiert. Dieses Ergebnis wurde durch die Arbeiten von DasSarma et al. (1984) bestätigt. Hier konnten allerdings vier kleine Fragmente identifiziert werden. Da der Bakterioopsindefekt durch eine Insertion von 0.5 kB zu Beginn des Gens verursacht wird (DasSarma et al. 1983), entstehen die kleineren Transkripte vermutlich durch ein Stoppsignal, das durch die Insertion in das Gen gebracht wird.

Diese Ergebnisse schlossen die hochmolekularen Proteine als Bakterioopsinvorläufer aus und deuteten darauf hin, daß der Bakterioopsin-messenger unter den in vitro Bedingungen nicht translatiert wurde.

Um die beobachtete Translationshemmung eindeutig zu beweisen, wurde versucht, die mRNA des Bakterioopsins im homologen System spezifisch zu translatieren. Da das System mit endogener mRNA bereits gesättigt war, mußte dieser vor der Zugabe der exogenen mRNA zerstört werden. Nach Vorinkubation des Zellrohextrakts konnte zwar eine Reaktivierung des Systems beobachtet werden, die Ergebnisse waren jedoch nicht reproduzierbar.

Nach Inkubation des Zellrohextrakts mit Micrococcus-Nuklease konnte ebenfalls die Initiation der Translation nach Zugabe exogener mRNA gezeigt werden, unter den drastischen Bedingungen, die im Hochsalz angewendet werden mußten, konnten aber auch hier keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Entweder war das System auch nach 1 stündiger Inkubation bei 37°C mit 150 Einheiten MicrococcusNuclease überhaupt nicht deaktiviert, oder aber die Ribosomen waren ebenfalls zerstört, und das System konnte nicht mehr reaktiviert werden. Die Abtrennung der Ribosomen aus dem Rohextrakt vor der Inkubation mit Micrococcus Nuclease brachte reproduzierbare Ergebnisse.

Zwei Voraussetzungen waren hierfür erforderlich:

- (1) Der gewonnene ribosomenfreie S_{100} Überstand mußte sich mit den isolierten Ribosomen wieder zu einem aktiven Extrakt rekonstituieren lassen, und
- (2) da unter den Inkubationsbedingungen die halobakterielle tRNS ebenfalls zerstört wurde, mußte sie durch exogene tRNS ersetzt werden können.

Die Rekonstitution des Translationsystems erwies sich als schwieriger als erwartet und konnte nur dann reproduzierbar durchgeführt werden, wenn das Verhältnis des S_{100} Überstandes zu den Ribosomen genauestens eingehalten wurde. Für jede Präparation mußte das Verhältnis neu ermittelt werden. Das System verliert verglichen mit dem Rohextrakt 80% der Aktivität.

Die halobakterielle tRNS konnte durch Hefe tRNS ersetzt werden. Dies ist nicht weiter erstaunlich, da die tRNS-Moleküle verglichen mit anderen stark konservierte Moleküle sind.

In diesem System konnte der Einbau von ^{35}S -Methionin um den Faktor 2 mit Gesamt-RNS und 2.5 mit mRNS gesteigert werden. Der auch nach Inkubation mit *Micrococcus* Nuclease noch hohe Hintergrund ist auf die an den Ribosomen gebundene mRNS zurückzuführen, die durch die Zentrifugation zusammen mit den Ribosomen abgetrennt wird. Durch eine weitere Reinigung der Ribosomen von mRNS lassen sich vermutlich bessere Reaktivierungsfaktoren erzielen. Im vergleichbaren zellfreien Translationssystem aus Hefe wurde nach Zugabe exogener mRNS der Einbau von Radioaktivität um den Faktor 5 gesteigert (Gasoir 1979). Im kauflichen Weizenkeimsystem wird die Translation durch Zugabe von Globin-mRNS um den Faktor 17 aktiviert. Die besten Ergebnisse wurden mit dem Coliphagen f2 im *E.coli*-Lysat erzielt. Hier beobachtete man eine 40-fachen Einbau von Radioaktivität (Nathans et al. 1962)

Da durch diese Ergebnisse streng genommen nur bewiesen war, daß nach Zugabe der exogenen mRNA die Translation neu initiiert wurde, mußte durch die Translation von exogener RNS die Entstehung neuer Produkte gezeigt werden. Dies konnte durch die Translation von RNS aus dem Stamm R₁ vor und nach Infektion mit dem halobakteriellen Phagen ϕ H nachgewiesen werden. R₁ unterscheidet sich phänotypisch von den Stämmen ET 1001, JW-5 und L33 vor allem durch die Bakterioruberine in der Membran. Die Bakterioopsinkonzentration entspricht der des Wildtyps. Die Markierung von Proteinen mit dem Molekulargewicht von 110, 108 und 43 kD, die sowohl in dem Micrococcus Nuklease behandelten System als auch im unbehandelten Rohextrakt nicht auftraten, konnten als positive Kontrolle des Translationssystems gewertet werden. Die Translation mit der RNS, die nach Infektion mit dem Phagen isoliert wurde, markierte schwach ein zusätzliches Protein mit einem Molekulargewicht von 80 kD. Daß es sich hier um ein Phagenprotein handeln könnte, wird bestärkt durch die Tatsache, daß ein prominentes Phagenprotein ein Molekulargewicht von 80 kD besitzt. Dies muß jedoch noch durch weitere Versuche bestätigt werden.

Die unter gleichen Bedingungen durchgeführte Translation der RNS-Fraktion, in der die mRNA des Bakterioopsins als prominente Bande identifiziert worden war, zeigte neben einer allgemeinen Verstärkung der Proteine, die auch im Rohextrakt synthetisiert werden, wiederum kein Bakterioopsin. Damit war der Beweis erbracht, daß unter diesen in vitro Bedingungen der Bakterioopsin-messenger nicht translatiert wurde.

Es gibt zwei Möglichkeiten, dieses Ergebnis zu interpretieren:

Die Translationshemmung wird durch einen Faktor, der dem eukaryontischen SRP ähnlich ist, verursacht. Diese Interpretation wird unterstützt durch Charakterisierung einer 7S RNS, die in den RNS Präparationen immer als

prominente Bande auftritt. Nach den Untersuchungen im Labor Goebel (persönliche Mitteilung) weist diese 7S RNS sowohl in der Sequenz als auch in der Sekundärstruktur starke Homologien zu der eukaryontischen 7S RNS auf, die als Teil des SRPs identifiziert wurde.

Diese Interpretation impliziert einen Prozessierungsmechanismus nach eukaryontischem Muster. Die großen Ähnlichkeiten des archaeobakteriellen und eukaryontischen Transkriptions- und Translationsapparates machen dieses wahrscheinlich. Der immunologische Vergleich der RNA-Polymerasen hat gezeigt, daß sich in der komplexen Zusammensetzung des archaeobakteriellen Enzyms ursprüngliche Merkmale der eukaryontischen und eubakteriellen RNA-Polymerasen konserviert zu haben scheinen. (Zillig et al. 1984)

In Analogie zum Transkriptionsapparat würde man im Prozessierungsmechanismus nach eukaryontischem Muster den ursprünglicheren finden. Nach dieser These hätten die Eubakterien im Laufe der Entwicklung die Prozessierung vereinfacht und zur Integration notwendige Faktoren wie SRP verloren. Diese Hypothese wird gestützt durch Ununterscheidbarkeit der pro- und eukaryontischen Signalsequenzen. Obwohl bislang die Beteiligung eines SRPs an der Translation von prokaryontischen Membranproteinen nicht nachgewiesen wurde, konnte am Beispiel der β -Lactamase, einem periplasmatischen E.coli Protein, gezeigt werden, daß die Signalsequenz des Proteins vom SRP erkannt und das Protein in vitro nach eukaryontischem Muster prozessiert wird (Müller et al. 1982). Die Archaeobakterien als "lebende Fossilien" hätten nach dieser These noch den ursprünglichen Prozessierungsapparat.

Gegen diese These spricht die atypische Signalsequenz des Bakterioopsinvorlaufers. Weder erkennt man hier die typische Unterteilung in einen hydrophilen und hydrophoben Bereich, noch findet man eine Anhäufung von basischen Aminosäuren im

ersten Drittel der Sequenz wie es von pro- und eukaryontischen Signalsequenzen bekannt ist. Stattdessen findet man zwei saure Aminosäuren, die in anderen Sequenzen nicht auftreten.

Die sauren Aminosäuren könnten allerdings auch Folge der Salzkonzentrationen sein. Auch bei den ribosomalen Proteinen findet man verglichen mit anderen Organismen einen hohen Prozentsatz an sauren Proteinen. In Organismen wie z.B. *Methanococcus arboriphilus*, dessen intracelluläre Salzkonzentration von 0.75 M die der Eubakterien überschreitet, beträgt der Anteil an sauren Proteinen 66% (Matheson & Yagushi 1982). Ob es sich bei der Sequenz des Vorläufers tatsächlich um ein Signal handelt, kann nur durch das Finden des SRPs oder eines ähnlichen Faktors bewiesen werden. Membranproteine aus anderen Archaeobakterien werden weitere Hinweise zum Prozessierungsmechanismus liefern.

Die zweite These fordert eine intakte Zelle zur Translation des Bakterioopsin-messengers. Dies ist bei anderen Proteinen noch nicht gefunden worden. Wohl kennt man eine Energieabhängigkeit der Integration des Proteins in die Membran, die Translation ist jedoch in keinem bekannten Fall von einer energetisierten Membran abhängig.

Beide Thesen schließen jedoch einen posttranslationalen Prozessierungsmechanismus aus und sprechen für eine cotranslationale Integration des Proteins in die Membran.

M.Steiner (1980) konnte zeigen, daß sich in der Purpurmembran noch zwei weitere Proteine befinden, die sich vom Bakterioopsin nur durch eine N-terminale Verlängerung von drei bzw. sechs Aminosäuren unterscheiden. Die Sequenz ergab, daß es sich bei diesen Proteinen um partiell prozessierte Vorläufer handelt. Ob die Proteolyse stufenweise erfolgt, oder ob sie die Produkte einer unspezifischen Protease sind, ist nicht bekannt. Im

membranfreien, cytoplasmatischen Überstand konnte der Vorläufer nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde ein Protein mit dem Molekulargewicht des reifen Bakterioopsins identifiziert. Da die Erfahrung gezeigt hatte, daß Bakterioopsin als stark hydrophobes Protein denaturiert nicht in Wasser gelöst werden kann, blieb die Vermutung, daß trotz der Kontrollen noch Membranen im cytoplasmatischen Überstand vorhanden waren. Dies wird dadurch bestärkt, daß nach Zentrifugation radioaktiv markierter PM im Bereich der cytoplasmatischen Proteine noch 2% Radioaktivität detektiert werden konnte. Die Inkubation mit CCCP, die eine Aufspaltung des Bakterioopsins in drei Banden hervorgerufen hatte, beeinflußt nicht die Menge des löslichen, cytoplasmatischen Bakterioopsins. Durch diesen Versuch konnte die Frage nach dem Prozessierungsmechanismus nicht beantwortet werden.

Die als Folge der CCCP Inkubation auftretenden drei Bakterioopsin-Banden sind wahrscheinlich keine biosynthetischen Vorstufen des Bakterioopsins, sondern es handelt sich vermutlich um die von M. Steiner (1980) beobachteten Bakterioopsin begleitenden Proteine, deren elektrophoretische Eigenschaften durch eine nicht bekannte Modifikation verändert werden.

Alle in-vivo Versuche zur Markierung des Bakterioopsin-vorläufers scheiterten. Obwohl Bakterioopsin in der späten logarithmischen und frühen stationären Phase das Hauptprodukt der Biosynthese ist, konnte auch in kurzen Zeitintervallen kein Vorläufer markiert werden. Unter anaeroben Bedingungen mit Arginin als Energiequelle änderte sich das Bild. Das Hauptprodukt der Biosynthese war ein 125 kD großes Protein. Durch ein 'pulse-chase'-Experiment konnte ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um ein Bakterioopsin verwandtes Protein handelt. Da mit Arginin unter limitierten Sauerstoffbedingungen nach wie vor das Bakterioopsin als Hauptprodukt erscheint, muß durch die anaeroben Bedingungen die Expression verändert werden. Da

die Funktion des Proteins nicht bekannt ist, sind weitere Aussagen nicht möglich. Es bleibt zu untersuchen, ob die Regulation auf der Transkriptions- oder Translationsebene erfolgt.

Die stochiometrische Synthese des Bakterioopsins und des Retinals ist für die Zelle ein notwendiges Prinzip. Fehlt den Zellen durch eine Mutation im Retinal Biosyntheseweg oder durch chemische Blockierung Retinal, wird Bakterioopsin vermindert synthetisiert. Fehlt den Zellen das Bakterioopsin wie im Stamm L-33, tritt Retinal nur in der stöchiometrischen Konzentration zum Halorhodopsin auf. Diese Koordination der Synthesewege ist nicht nur ein bei Halobakterien beobachtetes Prinzip, sondern gilt auch für das Sehpigment der Schmeißfliege (Paulsen & Schwemer 1983).

Die Frage nach der Kontrolle der beiden Biosynthesewege versuchte M.Sumper durch Wachstumsversuche mit "Nicotinzel-
len" und mit dem Retinalanalog 4-Keto-Retinal zu beantworten. Die Tatsache, daß auch bei Blockierung der Retinalsynthese überhaupt Bakterioopsin synthetisiert wurde, interpretierte er als Nachweis der Produktinhibition durch Bakterioopsin selbst. Da die Zugabe von 4-Keto-Retinal die Synthese des Retinals vollständig blockierte, und alles Bakteriorhodopsin als Chromophor das modifizierte Retinal enthielt, diskutierte M.Sumper für den Biosynthesweg des Retinals zwei Kontrollmechnismen.

- (1) Freies Bakterioopsin stimuliert die Retinalsynthese. 4-Keto-Retinal inhibiert die Synthese indirekt durch Wegfangen des freien Bakterioopsins.
- (2) freies Retinal und in diesem Fall auch das 4-Keto-Retinal blockieren die Synthese des Retinals.

Die Induktion der Retinalsynthese durch Bakterioopsin wird durch den Phanotyp des Stammes L-33 widerlegt. Trotz der

Bakterioopsindefizienz enthält des Halorhodopsin Retinal als Chromophor (Steiner 1984). Umgekehrt zeigt der Stamm JW-5, wie die "Nicotinzellen", daß Retinal die Synthese des Bakterioopsins nicht anschalten kann. Durch beide Stämme werden die Modelle auf die Aussage reduziert, daß diese Kontrollmechanismen nur das Ausmaß der Synthese beeinflussen können. Für diese Wirkung hatten die Versuche von M. Sumper keine Geltung.

Mit dem Stamm JW-5 stand eine Mutante zur Verfügung, die die Wachstumsversuche unter physiologischen Bedingungen erlaubte. In den Wachstumsversuchen wurden stark modifizierte Retinale eingesetzt, die alle vom Bakterioopsin unter Bildung des Chromophors akzeptiert wurden, deren Verstummelung jedoch die Eigenschaften des Bakteriorhodopsins stark beeinflussten.

Durch die Wachstumsversuche konnte Bakterioopsin als Inhibitor der eigenen Synthese ausgeschlossen werden. Bei keiner Verbindung korrelierte die gesamte Bakterioopsinkonzentration mit der des freien, nicht rekonstituierten Bakterioopsins.

Der Einfluß der Modifizierungen auf die Bakterioopsinsynthese sprechen für eine positive Kontrolle durch Retinal. Dies wird im Wachstumsversuch mit 13-Desmethylretinal besonders deutlich. Obwohl sich der Chromophor in der Purpurmembran befindet, die Modifikation die Biosynthese der Membran also nicht hindert, bleibt die Gesamt-opsinkonzentration deutlich unter dem natürlichen Wert. Die Bedeutung der 13 Position muß durch weitere modifizierte Retinale bestätigt werden.

Bei den Verbindungen (2) und (3) wird deutlich, daß die chromophorbildenden Eigenschaften keine Rückschlüsse auf die regulative Kraft zulassen. Da bei den Verbindungen freies, nicht rekonstituiertes Bakterioopsin nachgewiesen werden

konnte, und sie durch Retinal aus der Bindung verdrängt werden konnten, sind sie im Chromophor untauglich. Davon unabhängig ist ihre stimulierende Wirkung. Die Verstummelung des Retinals am Cyclohexenring vermindert die Bakterioopsin-synthese nicht, und durch beide Verbindungen wird die natürliche Bakterioopsinkonzentration erreicht oder im Falle von (2) sogar überschritten. Der Vergleich der Verbindungen (2) und (3) zeigt jedoch, daß die zusätzliche Verkürzung der Verbindung (3) die stimulierenden Eigenschaften verschlechtert. Die molekulare Wirkung des Retinals bleibt offen. Das Retinal kann direkt auf die Synthese wirken oder aber mit einem Repressor wechselwirken. Beide Möglichkeiten werden auch beim Sehpigment der Schmeißfliege diskutiert. Hier ist es das 11 *cis*-Retinal, dem die induzierende Wirkung zugesprochen wird. All-*trans* Retinal ist in diesem Fall unwirksam (Paulsen & Schwemer 1983).

Die Mutante JW-5 stammt von dem Bakteriorhodopsin-Überproduzenten ET 1001 ab. Obwohl der Bakterioopsingehalt nur 30% der Stammmutante beträgt, liegt die Bakterioopsinkonzentration mit 0,9 nMol/mg Protein wesentlich höher als in anderen retinaldefizienten Stämmen oder "Nicotinzellen". Die isolierte weiße Membran, die der braunen Membran aus "Nicotinzellen" entspricht (Sumper et al. 1976), enthält Bakterioopsin als Hauptprotein. Im unteren Bereich des Rohrzuckergradienten, konzentriert sich das Bakterioopsin und wird zum einzigen Protein der Membran. Das Bakterioopsin in der weißen Membran kann in vitro nach Rekonstitution zweidimensional kristallisiert werden.

Das Protein/Lipid Verhältnis wird durch die Kristallisation nicht beeinflusst, wie anhand der Dichte gezeigt werden konnte. Die Analyse des Röntgenbeugungsmusters zeigt, daß das Gitter sich von dem der PM unterscheidet. Dieses Ergebnis stimmt nicht mit den Ergebnissen von Hiraki et al. (1981) überein, die für die in-vitro kristallisierte Braune Membran die Gitterkonstante der PM ermittelten.

Diese Ergebnisse widersprechen der von M.Sumper entwickeltem Modell, das die Kristallisation der Membran als energieabhängigen Schritt darstellte. Seine Versuche, die mit dem Wildtyp R₁M₁ durchgeführt worden waren, ließen sich mit dem Stamm JW-5 nicht reproduzieren. Die Kristallisation der weißen Membran zur Purpurmembra wurde in vivo durch CCCP nicht verhindert. Die Erklärung liegt vermutlich in der höheren Bakterioopsinkonzentration des Stammes JW-5 verglichen mit R₁M₁ in Gegenwart von Nicotin.

Die Dichte der Membran kann in-vitro durch Inkubation der Membran mit n-Octylglycosid verändert werden. Bei diesem Prozeß ist das Retinal nicht entscheidend. Die weiße Membran mit der Dichte der PM ist nicht kristallin und kann mit Retinal nicht mehr rekonstituiert werden.

F Literaturverzeichnis

Alwine, J.C., Kemp, D.J., Parker, B.A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G.R. & Wahl, G.M. (1979) Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to Diazobenzyloxymethyl Paper; Meth. Enzymol. **68**, 220-242

Bayley, H., Huang, K., Radhakrishnan, R., Ross, A., Togagaki, Y., Khorana, G.H. (1981) Lysine 216 is the retinal binding site in Bakteriorhodopsin; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**, 2225-2229

Bayley, S.T. & Kushner, D.J. (1964) The ribosomes of the extremely halophilic bacterium *Halobacterium cutirubrum*; J.Mol.Biol. **9**, 654-669

Bayley, S.T. & Griffiths J. (1968) A cell free amino acid incorporation system from an extremely halophilic bacterium; Biol. **7**, 2249-2256

Betlach, M., Pfeifer, F., Friedmann, J., Boyer, H.W. (1983) Bacterio-opsin mutants of *Halobacterium halobium*; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 1426-1420

Blobel, G. & Dobberstein, B. (1975) Transfer of Proteins Across Membranes; J.Biol.Chem. **67**, 835-851

Burnette W.N. (1981) 'Western Blotting': Electrophoretic transfer of proteins from SDS page to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated Protein A; Anal. Biochem. **112**, 195-203

Chang,S., Majundar,A., Dunn,R., Makabe,O., RhajBhandari, U.L., Khorana,H.G., Ohtsuka,E., Tanaka,T., Tamiyama,Y.O. & Ikehara,M. (1981) Bacteriorhodopsin: Partial sequence of mRNA provides amino acid sequence in the precursor region; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **78**, 3398-3402

Carmichael,G.G., McMaster,G.K. (1980) The analysis of nucleic acids in gels using Glyoxal and Acridin Orange; Meth. Enzymol. **65**, 380-391

Chirgwin,J.M., Przybyl, A.E., MacDonald,R.J. & Rutter,W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease; Biochemistry **18**, 5294-5299

Daum,C., Gasser, S.M., Schatz,G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Energy dependant, two step processing of the inner membrane space enzyme cyt.c₂ by isolated yeast mitochondria; J. Biol. Chem. **257**, 13075-13080

DasSarma S., RajBhandari,U.L. & Khorana,H.G. (1983) High frequency spontaneous mutations in the Bakterioopsingene in *Halobacterium halobium* is mediated by transposable elements; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **80**, 2201-2205

Dellweg,W.G. & Sumper,M. (1980) Identification of a Bakterioopsin like species with a N-terminally extended amino acid sequence; FEBS Lett. **116**, 303-306

Emr,S.D., Hall,M.N., Silhavy,T.J. (1980) Mechanism of protein localisation: Signal hypothesis and bacteria; J. Cell Biol. **86**, 701-711

Emr,S.D., Hanley-Way,S., Silhavy,T.J. (1981) Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence; Cell **23**, 79-88

Gartner, W., Towner, P., Hopf, H., Oesterhelt, D., (1983) Removal of methyl groups from retinal control activity of Bakteriorhodopsin: Am. Chem. Soc. 22, 2637-2641

Gasior, E., Herrera, F., Sadnik, I., McLaughlin, C.S., Moldave, K., (1979) The preparation and characterisation of a cell-free system from *Saccharomyces cerevisiae* that translates natural messenger ribonucleic acid; J. Biol. Chem. 254, 3965-3969

Hegemann, P. (1984) Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität-München

Henderson, R. (1975) The Structure of the Purple Membrane; J. Mol. Biol., 93, 123-138

Henderson, R. & Unwin, P.N.T. (1975) Three dimensional model of Purple Membrane obtained by electron microscopy: Nature 257, 28-32

Hiraki, K., Toshiki, H., Mibum, T., Kito, Y., (1978) Formation of the two dimensional hexagonal lattice of Bakteriorhodopsin in reconstituted Brown Membrane; Biochim. Biophys. Acta 536, 318-322

Howes, C.D. & Batra, P.P. (1970) Accumulation of Lycopene and inhibition of cyclic carotenoids in *Mycobacterium* in the presence of nicotine; Biochim. Biophys. Acta 222, 174-179

Ito, K., Date, T., Wickner, W. (1980) Synthesis, assembly into the cytoplasmic membrane and proteolytic processing of the precursor of coliphage M 13 coat protein; J. Biol. Chem., 255, 2123-2130

Kessel, A. & Klink, F. (1980) Archaeobacterial elongation factor is ADP ribosylated by Diphtheria Toxin; Nature 287, 250-251

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of Bacteriophage T₄; *Nature* **227**, 680-685

Lake, J.A., Henderson, E., Clark, M.W. & Matheson, A.T. (1982) Mapping evolution with ribosome structure: Intralinear constancy and interlinear variation; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 5948-5952

Laskey, R.A. & Mill, A.D. (1975) Quantitative film detections of ³H and ¹⁴C polyacrylamide-gels by fluorographie; *Eur. J. Biochem.* **56**, 335-341

Lemke, H.D. & Oesterhelt, D. (1981) Lysine 216 is a binding site of the retinyl moiety in Bakteriorhodopsin; *FEBS Lett.* **128**, 255-260

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin reagent; *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275

Matheson, A.T. & Yagushi, M. (1982) The Evolution of the archaebacterial ribosome, *Zbl. Bakt. Hyg. I*, 192-199

McAda, P.C. & Douglas, M.G. (1982) A neutral metallo endoprotease involved in the processing of an F₁-ATPase subunit precursor in mitochondria; *J. Biol. Chem.* **257**, 3177-3182

Mueller, M., Ibrahimi, I., Chang, C.N., Walter, P. & Blobel, G. (1982) A bacterial secretory protein requires SRP for translocation across mammalian endoplasmic reticulum; *J. Biol. Chem.* **257**, 11860-11863

Nathans, D., Notani, G., Schwartz, J.H., Zinder, N.D. (1962) Biosynthesis of the coat protein of coliphage f2 by E.coli extracts; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **48**, 1424-1431

Oesterhelt,D. (1982) Reconstitution of the retinal proteins Bakteriorhodopsin and Halorhodopsin; Meth. Enzymol. **88** 10-17

Oesterhelt,D. and Hess,B., (1973) Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of *Halobacterium halobium*; Eur.J. Biochem. **37**, 316-326

Oesterhelt,D. & Stoeckenius,W. (1973) Functions of a new photoreceptor membrane Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **70**, 2853-2875

Oesterhelt,D. & Stoeckenius,W. (1974) Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into Red and Purple Membrane, Meth. Enzymol. **31**, 667-678

Oliver,D.B., Beckwith,J., (1981) E. coli mutant pleiotropically defective in the export of secreted proteins; Cell **25**, 765-772

Oliver,D.B., Beckwith,J., (1982) Regulation of a membrane component required for protein secretion in *Escherichia coli*; Cell **30**, 311-319

Paulsen,R. & Schwemer,J. (1983) Biogenesis of bowfly receptor membranes is regulated by 11 cis retinal; Eur. J. Biochem. **137**, 609-614

Randall,L. & Beckwith,J (1984) Transport of proteins across membranes. Dogma and data; Modern Cell Biology in press

Reid,G.A. & Schatz,G. (1982a) Import of Proteins into Mitochondria. Extramitochondrial pools and posttranslational import of mitochondrial protein precursors in vivo, J. Biol. Chem. **257**, 13062-13067

Reid,G.A. & Schatz,G. (1982b) Import of Proteins into Mitochondria. Yeast cells grown in the presence of Carbonyl Cyanid m-Chlorophenylhydrazon accumulate massive amounts of some mitochondrial precursor polypeptides; J. Biol. Chem.; 257, 13056-13061

Rigby,P.W.J., Deckmann,M., Rhodes,C. & Berg,P. (1977) Labeling Deoxyribonucleic Acid to high specific activity in vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I; J. Mol. Biol. 13, 237-251

Sabatini,P.D., Kreibich,G., Morimoto,T., & Adesnik,M. Mechanism for the Incorporation of Proteins in Membranes and Organelles; J. Cell Biol. 92, 1-22

Schnabel,R., Thomm,M. Gerady-Schahn,R., Zillig,W., Stetter,K.O. & Huet,J. (1983) Structural homology between different archaebacterial DNA dependant RNA polymerases analysed by immunological comparison of their components; EMBO J. 2, 751-755

Seehra,J.S. & Khorana,G.H. (1984) Bakteriorhodopsin Precursor. Characterisation and its integration into the Purple membrane; J. Biol. Chem. 259, 4187-4193

Sumper,M. & Herrmann,G. (1976) Biogenesis of Purple Membrane. Regulation of Bakterioopsin synthesis; FEBS Lett. 61, 149-152

Sumper,M. & Herrmann,G. (1978) Studies on the Biosynthesis of Bakterioopsin; Eur. J. Biochem. 89, 229-235

Sumper,M., Reitmeier,G. Oesterhelt,D. (1976) Zur Biosynthese der Purpurmembra von Halobakterien; Angew. Chem. 88 203-210

Steiner,M. (1980) Diplomarbeit der Chemie

Tu.J. (1982) Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Towbin,H., Staehelin,T. & Gordon,J. (1979) Electrophoretic Transfer of proteins from poyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **76** 4350-4354

Wagner,C., Oesterhelt,D., Krippahl,G., Lanyi,J.K.. (1981) Bioenergetic role of halorhodopsin in Halobacterium halobium cells: FEBS Lett. **131**, 341-345

Walter,P. & Blobel,G. (1981a) Translocation of Proeins Across Endoplasmatic Reticulum I; Signal Recognition Protein (SRP) binds to in vitro assembled polysomes synthesizing secretory protein: J. Cell Biol. **91**, 545-550

Walter,P. & Blobel,G. (1981b) Translocation of Proteins Across Endoplasmatic Reticulum II; Signal Recognition Protein (SRP) mediates the selecitve binding to microsomal membranes of in-Vvtro-assembled polysomes; J. Cell. Biol. **91**, 551-556

Walter,P. & Blobel,G. (1981c) Translocation of Proteins Across Endoplasmatic Reticulum III; Signal Recognition Protein (SRP) causes signal sequence dependant and site specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes: J. Cell Biol. **91**, 557-561

Wickner,W. (1979) The Assembly of Proteins into Biological Membranes: The Membrane Trigger Hypothesis; Ann. Rev. Biochem. **48**, 23-45

Zillig,W., Schnabel,R., Stetter,K.O., Tomm,M., Gropp,F. & Reiter,W.D. (1984) The evolution of the transcription apparatus; in press

G Abkürzungen

A	Angstrom (10^{-10} m)
Ala	Alanin
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BO	Bakterioopsin
BR	Bakteriorhodopsin
BS	Basalsalz
BSA	Rinderserumalbumin
CCCP	m-Chlorphenylhydrazon des Mesoxalsäuredinitrils
cpm	counts per minute
Cyt.C	Cytochrom C
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(aminoethylether)-N,N'- tetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyant
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
M	Molar
Met	Methionin
min	Minute
OD	Optische Dichte
PEP	Phosphoenolpyrophosphat
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulphat
sec	Sekunde
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Polyoxyethylenglykol-(9,10)-p-octylphenol
u	μ

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1980 bis Februar 1984 auf Anregung und unter Leitung von Prof.Dr.D.Oesterheld am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Herrn Prof. Oesterheld danke ich herzlich für die Unterstützung und Förderung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Weber danke ich für die Stämme ET 1001 und JW-5.

Herr Dr. W.Bode half mir bei der Aufnahme und Auswertung der Röntgenbeugung der in-vitro kristallisierten Membran.

Herr Dr. R. Henderson danke ich für die Aufnahme der Röntgenbeugung der mit den Retinalanalogen rekonstituierten Apomembran.

Für die schon sprichwörtliche Hilfsbereitschaft und Kameradschaftlichkeit in der Abteilung, die ich ganz besonders während des Schreibens dieser Arbeit gespürt habe, möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meiner Tochter Claire-Marie, die mir durch ihr unkompliziertes und freundliches Wesen das Schreiben dieser Arbeit sehr erleichterte.

Lebenslauf

Name	Roswitha Schöningh
geboren	20.5.55 in Paderborn
Vater	Ferdinand Schöningh, Verleger
Mutter	Hildegard Schöningh, geb. Behler
1960-1964	Grundschule
1964-1973	Neusprachliches Gymnasiums
1973	Abitur
1973-1974	Studium der Philosophie an der Universität Bonn
1974-1980	Studium der Chemie an der Universität Würzburg und Diplomprüfung
1979-1980	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof.Dr.D.Oesterhelt über das Thema: Die Synthese von 4-Alkoxy-Retinalen und ihre chromophorbildenden Eigenschaften im Bakterioopsin
1980-1984	Doktorarbeit unter Anleitung von Prof.Dr.D.Oesterhelt

